

**Synthese und biophysikalische Evaluierung von
H- und K-Ras-Proteinen sowie Arbeiten zur
Aufklärung des Protein-Acylierungskreislaufes**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität Dortmund

Eingereicht von Dipl. Chem. Sebastian Koch

aus Amöneburg

Dekan: Prof. Dr. Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. ir. L. Brunsveld

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2010

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann an der TU Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, in der Zeit von Dezember 2005 bis Dezember 2009 angefertigt.

Für Christina und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Isoformen der kleinen GTPase Ras	1
1.2 Der Ras-Raf-Mek-Erk Signalweg.....	4
2. Allgemeiner Teil	7
2.1 Posttranslationale Modifizierungen.....	7
2.2 Synthese lipidierter Peptide.....	12
2.3 Synthese lipidierter Proteine.....	15
2.3.1 Synthese lipidierter Proteine mittels enzymvermittelter Lipidierung.....	15
2.3.2 Ligationstechniken für die Synthese lipidierter Proteine	16
3. Ziel der Arbeit	21
3.1 Semisynthetische K-Ras4B Proteine.....	21
3.2 Der Protein Acylierungskreislauf.....	22
4. Spezieller Teil	24
4.1 Synthese von K-Ras4B Proteinen	24
4.1.1 Strategie für die Synthese der K-Ras4B Proteine	24
4.1.2 Synthese der Aminosäurebausteine	26
4.1.3 Festphasenpeptidsynthese von K-Ras4B Peptiden	29
4.1.4 Diskussion	35
4.1.5 Synthese des K-Ras4B Δ 1-174 Proteinthioesters	35
4.1.6 Ligation des K-Ras4B Δ 1-174 Proteinthioesters mit unterschiedlichen C-terminalen K-Ras4B Peptiden	36
4.1.7 Diskussion	39
4.1.8 Biologische Evaluierung von semisynthetischem K-Ras4B.....	40
4.2 Synthese von H-Ras Proteinen durch Expressed Protein Ligation	42
4.3 Biophysikalische Charakterisierung eines potentiellen isoprenylsensitiven K-Ras4B Interaktors	44
4.3.1 Die δ -Untereinheit der Phosphodiesterase 6	44
4.3.2 Oberflächenplasmonenresonanz-Experimente	45
4.3.3 Fluoreszenzpolarisationsexperimente	47
4.3.4 Diskussion	54

4.4	<i>Biophysikalische Analyse der Membraninteraktion von K-Ras4B und seiner Analoga</i>	56
4.4.1	Untersuchung der Membraninteraktion unterschiedlicher K-Ras4B-Analoga mittels der Oberflächenplasmonenresonanz	58
4.4.2	Diskussion	64
4.4.3	Rasterkraftmikroskopie-Untersuchungen des Membranverhaltens von K-Ras4B	66
4.4.4	Diskussion	69
4.5	<i>Arbeiten zur Aufklärung des Protein Acylierungskreislaufes</i>	70
4.5.1	Synthese N-myristoylierter und nicht-lipidierter Peptide	72
4.5.2	Semisynthetische Proteine durch MIC-Ligation	77
4.5.3	„Life-time imaging“ unterschiedlicher Fusionsproteine zur Aufklärung des Proteinacylierungskreislaufs	79
4.5.4	Diskussion	82
5.	Zusammenfassung	84
5.1	<i>Semisynthetische K-Ras4B Proteine</i>	84
5.2	<i>Der Acylierungskreislauf</i>	88
6.	Experimenteller Teil	91
6.1	<i>Messgeräte und Hilfsmittel</i>	91
6.2	<i>Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)</i>	93
6.3	<i>Versuche zu Kapitel 4.1.2</i>	98
6.4	<i>Versuche zu Kapitel 4.1.3</i>	103
6.5	<i>Versuche zu Kapitel 4.1.4 und 4.1.5</i>	110
6.6	<i>Versuche zu Kapitel 4.2</i>	113
6.7	<i>Versuche zu Kapitel 4.3</i>	117
6.8	<i>Versuche zu Kapitel 4.4</i>	131
6.9	<i>Versuche zu Kapitel 4.5</i>	132
7.	Literaturverzeichnis	151
8.	Abkürzungsverzeichnis	159
9.	Anhang	161

9.1	<i>Danksagung</i>	161
9.2	<i>Lebenslauf</i>	162
9.3	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	163

1. Einleitung

Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) übersetzen extrazelluläre Signale in intrazelluläre Ereignisse, die in den meisten Fällen durch sogenannte Second-Messenger-Kaskaden ausgelöst werden.^[1] Eine wichtige Gruppe guaninnukleotid-bindender Proteine sind die monomeren kleinen GTPasen. Innerhalb der kleinen G-Proteine ist die Superfamilie der Ras-GTPasen wahrscheinlich am besten untersucht. Sie besteht aus über 100 kleinen monomeren G-Proteinen zwischen 20 und 40 kDa,^[2] die sich strukturell in fünf unterschiedliche Klassen einteilen lassen. Die Proteine der einzelnen Klassen sind für zentrale biologische Prozesse in der Zelle, wie Signaltransduktion (Ras), die Organisation des Cytoskeletts (Rho), Genexpression (Ras, Rho), intrazellulären Vesikeltransport (Rab, Arf) und den Kerntransport (Ran) verantwortlich.^[3-7] Neben ihren unterschiedlichen dreidimensionalen Strukturen und biologischen Funktionen haben sie gemeinsam, dass sie GDP/GTP binden und eine intrinsische GTP-Hydrolysefunktion besitzen. Diese ermöglicht es ihnen, zwischen dem aktiven GTP- und inaktiven GDP-gebundenen Zustand zu wechseln.^[8] Diese Funktion als molekulare Schalter ist stark reguliert und durch ein komplexes Netzwerk von drei unterschiedlichen Proteintypen kontrolliert. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) verstärken die intrinsische GTP-Hydrolysefunktion bedeutend.^[9] Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) ermöglichen den Austausch von gebundenem GDP durch GTP,^[10] also den Wechsel vom inaktiven in den aktiven Zustand. Sogenannte Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs), können einige kleine GTPasen in ihrem inaktiven Zustand stabilisieren und sie aus der Plasmamembran herauslösen.^[11]

1.1 Die Isoformen der kleinen GTPase Ras

Ras-Proteine sind unter anderem an der cytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert.^[12-13] Sie besitzen keine Transmembrandomänen, werden vielmehr als hydrophile Proteine an freien Polysomen synthetisiert und durch posttranslationale Modifikationen an der Plasmamembran verankert.^[14] Diese posttranslationalen Modifikationen sind nicht nur für die stabile Membranverankerung verantwortlich, sondern vermitteln auch Protein-Protein-Interaktionen, schützen vor proteolytischem Abbau und regulieren die Lokalisierung in unterschiedlichen Membrandomänen.^[15]

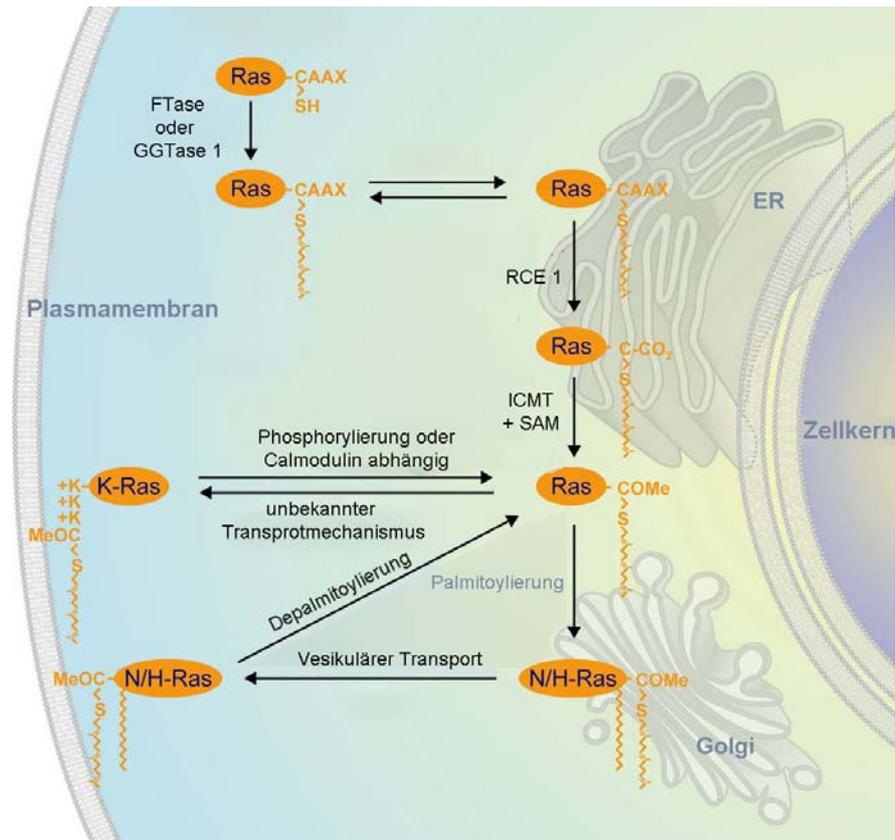


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prenylierungs- und Postprenylierungsreaktion, durch die die Ras GTPasen posttranslational modifiziert werden.^[16] Alle drei Isoformen werden durch die Farnesyltransferase (FTase) farnesyliert (in Ausnahmefällen können N-Ras und K-Ras durch die Geranylgeranyltransferase I (GGTase I) geranylgeranyliert werden). Danach werden am endoplasmatischen Retikulum proteolytisch das AAX Tripeptid durch RCE1 (ras converting enzyme 1) abgespalten und der C-Terminus durch ICMT (Protein-S-isoprenylcystein O-Methyltransferase) carboxymethyliert. N- und H-Ras werden am Golgi-Apparat palmitoyliert und gelangen von dort über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran, an die sie durch den Farnesyl- und Palmitoylrest gebunden werden. Durch Depalmitoylierung gelangen sie wieder ins Cytoplasma, assoziieren mit Endomembranen und treten am Golgi-Apparat durch Palmitoylierung wieder in den Kreislauf ein. K-Ras dagegen wird nicht palmitoyliert, sondern gelangt direkt zur Plasmamembran, wo es durch seinen Farnesylrest und die positiv geladene polybasische Sequenz eine stabile Membranbindung eingeht. Durch Phosphorylierung des C-Terminus oder durch einen calmodulinabhängigen Prozess kann K-Ras wieder mit Endomembranen assoziieren. FTase: Farnesyltransferase; GGTase I: Geranylgeranyltransferase I; ICMT: Protein-S-isoprenylcystein O-Methyltransferase; RCE1: ras converting enzyme 1; SAM: S-Adenosylmethionin.

Daher gehören die Ras GTPasen auch zur Familie der sogenannten CAAX-Proteine. CAAX bezieht sich auf die letzten C-terminalen Aminosäuren dieser Proteine (C: Cystein; A: aliphatische Aminosäure; X: beliebige Aminosäure).

Dieses CAAX-Motiv ist die Erkennungssequenz für die Farnesyltransferase (X: beliebige Aminosäure, jedoch nicht Leucin) oder die Geranylgeranyltransferase I (X: Leucin). Beide transferieren den entsprechenden als Pyrophosphat aktivierten Isoprenylrest auf die Seitenkette des Cysteins im CAAX-Motiv.^[17-18] Nach der Prenylierung werden die Ras-Proteine am endoplasmatischen Retikulum weiter modifiziert, indem die drei C-terminalen Aminosäuren (AAX) durch RCE1 (ras converting enzyme 1) abgespalten werden. Die freie Carbonsäure des C-terminal lipidierten Cysteins wird dann durch ICMT (Protein-S-isoprenylcystein O-Methyltransferase) carboxymethyliert (Abbildung 1).^[19]

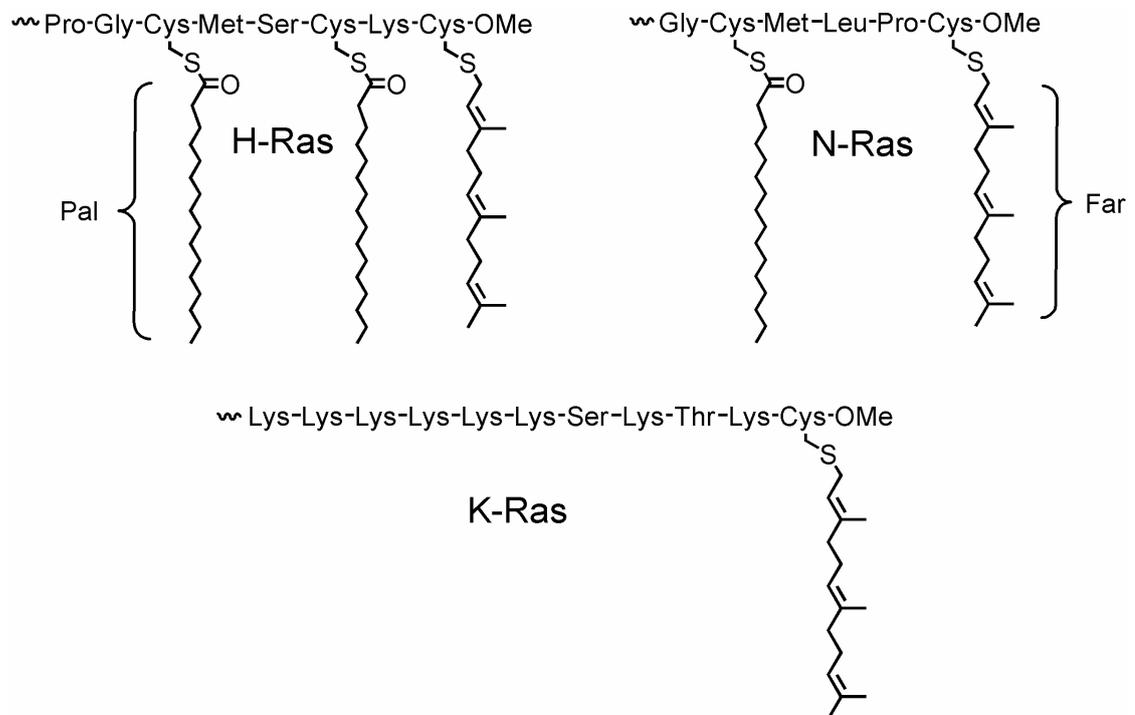


Abbildung 2: Schematische Darstellung der unterschiedlichen C-Termini von H-, N- und K-Ras. Pal: Palmitoyl, Far: Farnesyl.

Da neben dem Farnesylrest ein weiteres „membrane-targeting“ Signal für eine stabile Membranbindung notwendig ist,^[20] beschreiten die Ras Isoformen nach der Carboxymethylierung unterschiedliche Wege. N- und H-Ras werden an einem zusätzlichen Cystein in der Nähe des C-Terminus am Golgi-Apparat palmitoyliert (Abbildung 2) und gelangen über den sekretorischen Weg an die Innenseite der Plasmamembran.^[13, 21-22] Nach der Depalmitoylierung verlieren sie ihre stabile Membranassoziation,

gelangen ins Cytoplasma und assoziieren reversibel mit unterschiedlichen Endomembranen, um dann durch Palmitoylierung am Golgi-Apparat wieder dem Kreislauf zugeführt zu werden.^[21] K-Ras dagegen gelangt über einen noch nicht bekannten Mechanismus direkt an die Plasmamembran.^[13, 22] Dort wird es stabil durch die Kombination der hydrophoben Interaktionen des Farnesylrestes und der elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen den negativ geladenen Lipiden der Plasmamembran und der positiv geladenen polybasischen Sequenz des C-Terminus von K-Ras verankert.^[20, 23] Die Proteinkinase C-vermittelte Phosphorylierung des C-Terminus ermöglicht einen sogenannten „electrostatic switch“, bei dem K-Ras4B seine stabile Plasmamembranverankerung verliert, mit Endomembranen assoziiert und an den Mitochondrien über einen Bcl-X_L-abhängigen Signalweg Apoptose auslöst.^[24] Weiterhin hat K-Ras4B die Möglichkeit calmodulinabhängig von der Plasmamembran zu dissoziieren (Abbildung 1).^[25-28]

Da die unterschiedlichen Isoformen eine hohe Sequenzhomologie in der für die Schalterfunktion und die Bindung von Effektoren verantwortlichen G-Domäne besitzen, konnten in biochemischen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen ausgemacht werden.^[29] Die isoformspezifischen zellulären Signalantworten, die in klinischen und zellbiologischen Studien beschrieben werden,^[30] können auf die verschiedenen posttranslationalen Modifizierungen zurückgeführt werden. Die unterschiedlichen Membrananker (Abbildung 2) sind für die subzelluläre Membranverteilung verantwortlich^[30-31] und haben somit eine ortsabhängige Signaltransduktion und die damit verknüpfte biologische Reaktion zur Folge^[32-33].

1.2 Der Ras-Raf-Mek-Erk Signalweg

Ras-Proteine sind in eine Vielzahl von Signalkaskaden involviert, in denen sie als Vermittler zwischen extrazellulären Signalen und den entsprechenden Zielmolekülen in der Zelle fungieren. Dabei werden unter anderem zahlreiche Transkriptionsfaktoren reguliert, wie z.B. Elk-1. Bis dato sind über 100 Gene bekannt, deren Expression durch Ras-Proteine reguliert werden.^[34-37]

Der wohl am besten untersuchte Signalweg, der von Ras gesteuert wird, ist der MAPK-Signalweg (mitogen-activated protein kinase) (Abbildung 3). Dieser Signalweg beginnt mit der liganden-induzierten Dimerisierung transmembraner Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie z.B. des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor receptor).^[38] Dadurch kommt es zur Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinseitenketten des Rezeptors. An diesen phosphorylierten Tyrosinseitenketten des dimerisierten

Rezeptors bindet ein cytosolischer Proteinkomplex bestehend aus den Proteinen Grb2 (growth factor receptor bound 2) und Sos (son of sevenless).^[34, 39-41] Grb2 besitzt keine katalytische Aktivität, sondern fungiert ausschließlich als Adaptor-Protein, das Sos aus dem Cytosol an die Plasmamembran dirigiert und dadurch das Signal des EGF-Rezeptors an Ras-Proteine weiterleitet.^[42-45]

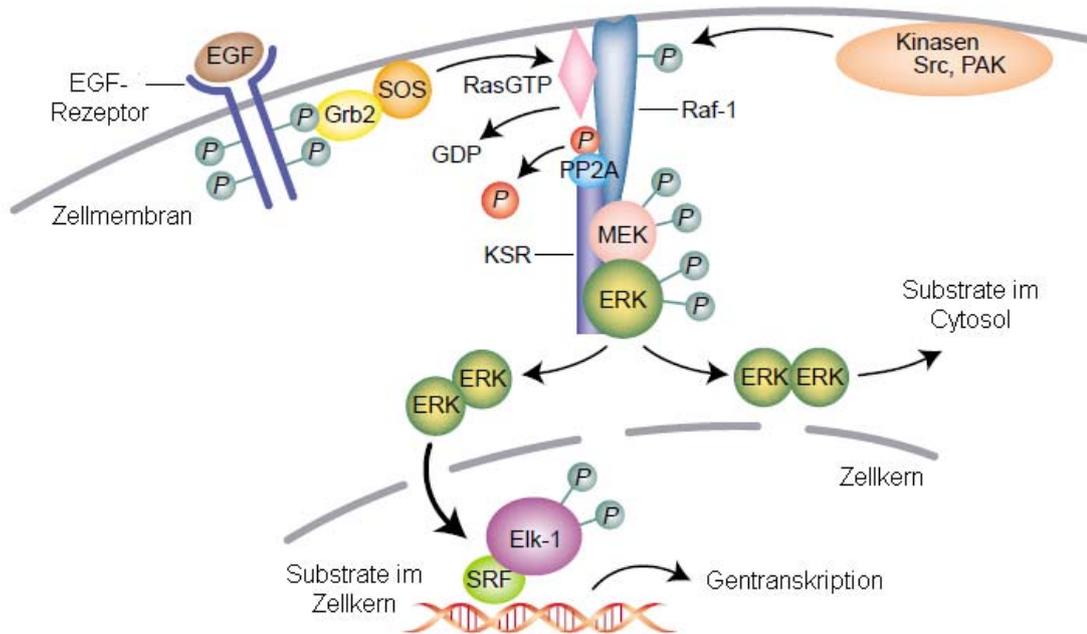


Abbildung 3: Organisation und Funktion des Ras-Raf-Mek-Erk Signalwegs.^[46]

Sos ist ein GEF für Ras, fördert daher den Austausch von GDP zu GTP und überführt Ras somit in seine aktive Form. Die Bindung von Sos löst die Dissoziation von GDP aus und Ras kann GTP spontan binden. Die daraus resultierende Konformationsänderung führt zur Dissoziation des GEFs.^[39-41] Diese Konformationsänderung erlaubt es der Effektdomäne von Ras, mit der RBD (Ras-Binding-Domain) von Raf zu interagieren und es an die Plasmamembran zur rekrutieren.

Zwar ist die Aktivierung von Raf ein mehrstufiger Prozess, die Lokalisierung an der Plasmamembran ist jedoch dafür der Auslöser. So werden durch Phosphatasen, wie PP2A (Phosphatase 2A), inhibitorische Phosphorylierungen entfernt und Raf durch Kinasen wie PAK3 oder Kinasen der Src-Familie aktiviert. Nur durch die Kombination der einzelnen Modifikationen kann Raf aktiviert werden.^[47] Im weiteren Verlauf phosphoryliert es dann die MAPK-Kinase MEK, welche wiederum die MAP-Kinase ERK2 (extracellular-signal-regulated kinase 2) phosphoryliert, die daraufhin in den Kern transportiert wird, dort Elk-1 und andere Transkriptionsfaktoren aktiviert, die dann u.a. Zellwachstum stimulieren können.^[48-52] Weiterhin kann der Signalweg durch Gerüstproteine wie KSR (kinase supressor of ras), die sowohl Raf als auch Mek und

Erk binden, und dadurch die Signalkaskade räumlich organisieren und auf diese Art die Signaltransduktion verstärken, positiv reguliert werden.^[53] Im Gegensatz dazu können Proteine wie RKIP (raf kinase inhibitor protein) die Wechselwirkung zwischen Raf und Mek verhindern und somit den Signalweg herunter regulieren.^[54]

In 20-30% aller Tumore sind mutierte Ras-Proteine zu finden.^[55] Dies ist aufgrund der zentralen Rolle, die sie in der Signaltransduktion einnehmen, nicht verwunderlich. Die häufigste Mutation ist eine Punktmutation (G12V), die die Hydrolase-Funktion zerstört und die Interaktion mit GAPs verhindert. So können diese mutierten Ras-Proteine gebundenes GTP nicht mehr hydrolysieren und verbleiben dauerhaft im aktiven Zustand.^[13, 56] Die dauerhafte, von extrazellulären Ereignissen unabhängige Signaltransduktion kann dann in einem mehrstufigen Prozess zur Tumorgenese führen.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Posttranslationale Modifizierungen

Es gibt zwei prinzipielle Möglichkeiten die über 30000 Gene des eukaryotischen Genoms weiter zu diversifizieren und dadurch ein um den Faktor 2-3 komplexeres Proteom zu erhalten. Durch RNA-Splicing besteht zum Einen schon auf genetischer Ebene die Möglichkeit der Diversifikation.^[57-58]

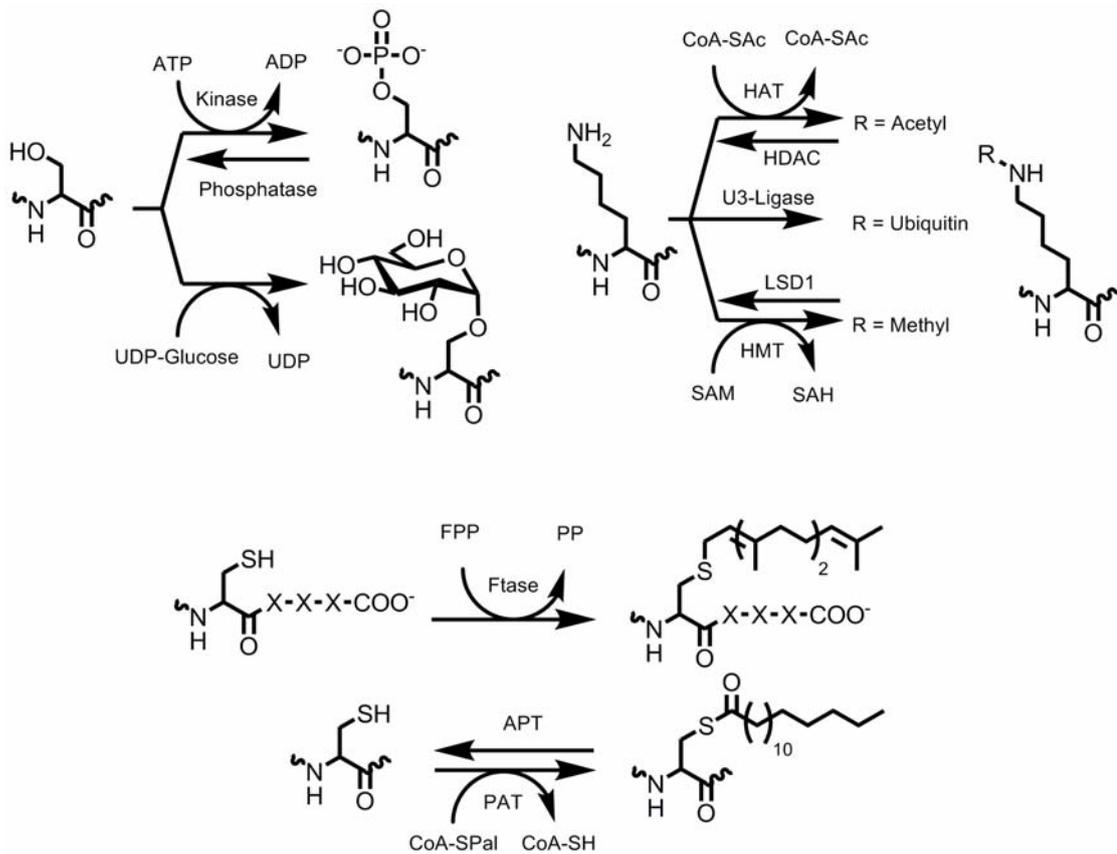


Abbildung 4: Schematische Darstellung der häufigsten posttranslationalen Modifikationen: Phosphorylierung, Lipidierung, Ubiquitinierung, Acetylierung, Methylierung und Glykosylierung. Wenn die posttranslationale Modifikation reversibel ist, wurde die Rückreaktion ebenso aufgeführt. Diese sind am Beispiel der Modifikationen von Serin, Lysin und Cystein dargestellt. Ac: Acetyl; APT: Acylproteinthioesterase; ATP: Adenosintri-phosphat; ADP: Adenosindiphosphat; CoA: Coenzym A; FPP: Farnesylpyrophosphat; Ftase: Farnesyltransferase; HAT: Histonacetyltransferase; HDAC: Histondeacetylase; HMT: Histonmethyltransferase; Pal: Palmitoyl; PAT: Palmitoylacyltransferase; PP: Pyrophosphat; UDP: Uridindiphosphat.

Zum Anderen kann das Proteom weiterhin durch posttranslationale kovalente Modifikationen einzelner Proteine erweitert werden. Die Funktion ca. 5% aller im eukaryotischen Genom codierten Enzyme wird mit posttranslationalen Modifikationen in Verbindung gebracht.^[59] Dabei unterscheidet man die kovalente Addition unterschiedlichster elektrophiler Gruppen an nukleophile Aminosäureseitenketten und die kontrollierte Spaltung des Proteinrückgrates durch Proteasen oder autokatalytische Prozesse. Außer für Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin und Phenylalanin sind für alle proteinogenen Aminosäuren posttranslationale Modifikationen bekannt.^[59] Die häufigsten posttranslationalen Modifikationen sind die Phosphorylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung, Acetylierung, Methylierung und Lipidierung (Abbildung 4). In Säugetierzellen besteht das Phosphoproteom aus phosphorylierten Serinen, Threoninen und Tyrosinen. Das Zusammenspiel aus Phosphorylierung durch Kinasen und Dephosphorylierung durch Phosphatasen ist eines der zentralen Regulations-elemente für die Signaltransduktion und hat einen sehr großen Einfluss auf die Proteomdiversifizierung.^[59]

Die Ubiquitinylierung einer ϵ -N-Lysinseitenkette kann je nach Art und Anzahl der Ubiquitin-Bindungen, die Halbwertszeit, die Funktion oder die Verteilung eines Proteins innerhalb der Zelle beeinflussen.^[60] Ubiquitinylierung wird in höheren Eukaryoten von mehreren hundert E3 Ubiquitin-Ligasen durchgeführt.^[61-62] Monoubiquitinylierung kann die Relokalisierung transmembraner Rezeptoren von der Plasmamembran z.B. zum Golgi-Apparat, zu frühen Endosomen oder Lysosomen auslösen.^[63-64] Polyubiquitinylierte Proteine werden im Proteasom hydrolytisch abgebaut.^[65]

ϵ -N-Acetylierungen findet man häufig an mehreren Lysinseitenketten in N-terminalen Regionen von Histonen^[66] oder am C-Terminus des Transkriptionsfaktors p53.^[67] Sie werden als ein integraler Bestandteil des epigenetischen Codes angesehen, der die Gentranskription kontrolliert.^[66] Auch die N-Methylierung von Lysin- und Argininseitenketten spielen besonders in der funktionellen Regulierung der Histone eine Rolle^[68] und ergänzen somit die Acetylierung.

Glykolysierte Proteine sind charakteristisch für eine Vielzahl von Zelloberflächen und sekretierten Proteinen. Die Glykolysierung ist durch ihre Heterogenität charakterisiert, bei der unterschiedliche Glykoformen eines Proteins auftreten können.^[69] Dies kommt zustande, da unterschiedliche Asparagin-, Serin oder Threoninseitenketten eines Proteins mit unterschiedlichen Oligosacchariden N- bzw. O-glykosidisch verknüpft werden können.^[70] Die Funktion der Glykolysierung ist ebenso heterogen, sie reicht von der Unterstützung bei der Proteinfaltung über Aufgaben im intrazellulären

Transport bis hin zu unterschiedlichen Funktionen in der extrazellulären Matrix als sogenannte Glykokalyx.

Neben den schon erwähnten Ras-Proteinen gibt es hunderte unterschiedlicher Proteine, die kovalent mit Lipidresten verknüpft sind. Die Funktion der Lipidierung besteht sowohl in der Verankerung der Proteine an Membranen als auch in der Modulierung von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei werden hauptsächlich fünf unterschiedliche Typen der Modifikation unterschieden: N-Myristoylierung, S-Palmitoylierung, S-Isoprenylierung, Veresterung des Protein C-Terminus mit Cholesterin oder Glykosylphosphatidyl-Inositol (Abbildung 5).^[71]

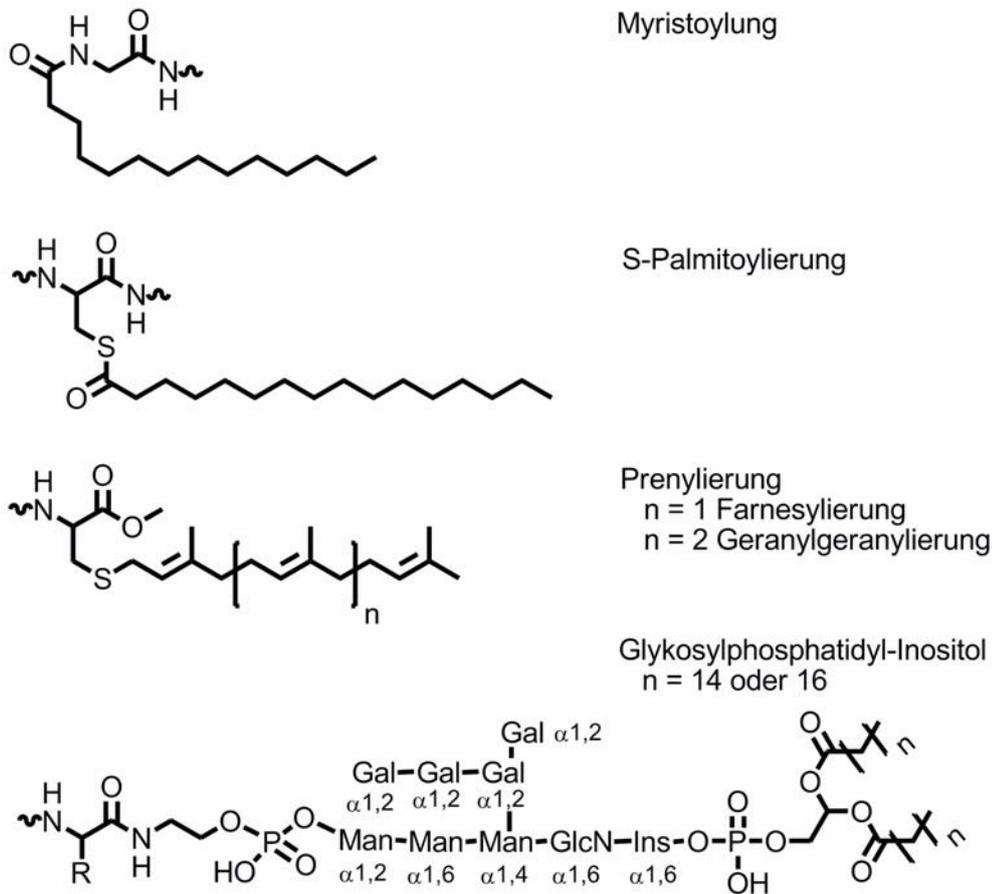


Abbildung 5: Unterschiedliche posttranslationale Lipidierungen von Proteinen. Man: Mannose; Gal: Galactose; GlcN: Glucosamin; Ins: Inositol.

Eukaryotische Proteine werden an N-terminalen Glycinen myristoyliert. Dafür muss das N-terminale Methionin, mit dem die Proteinsynthese initiiert wird, durch die Methionin-Peptidase abgespalten werden. Die N-Myristoyltransferase überträgt dann das C₁₄-Coenzym A (CoA) Substrat auf das N-terminale Glycin.^[72] Die Myristoylierung erhöht die Hydrophobizität der Proteine und dirigiert sie an entsprechende Membrankompartimente.^[73] Der Myristoylrest kann auch in hydrophoben Proteinspalten

verborgen sein und erst durch eine Konformationsänderung, den sogenannten „myristoyl-switch“ des Proteins für die Membraninsertion zur Verfügung stehen.^[74] Prominente Beispiele myristoylierter Proteine sind das HIV Gag Protein^[75] und die Protein Kinase A^[76].

Wie schon erwähnt werden die Pyrophosphat-aktivierten C₁₅- (Farnesyl) oder C₂₀- (Geranylgeranyl) Isoprenylreste durch die Farnesyl- oder Geranylgeranyltransferase I und II auf eine entsprechende Cysteinseitenkette der sogenannten C-terminalen CAAX-Box unterschiedlicher Proteine übertragen. Neben den Proteinen der Ras-Familie werden auch viele andere kleine GTPasen, wie z.B. die Rab-Proteine, durch Isoprenylreste über eine stabile Thioether-Bindung modifiziert.^[77] Die Rab-Proteine besitzen zwei Cysteine am C-Terminus (CCXX), die beide geranylgeranyliert werden. Für ihre Prenylierung ist ein weiteres Protein, das sogenannte „rab escort protein“ (REP), das das neu synthetisierte Rab bindet und im Komplex der Geranylgeranyltransferase II präsentiert, notwendig. Im nächsten Schritt fungiert REP als Chaperon bindet die eingeführten Geranylgeranylreste, schirmt sie somit gegen das Cytoplasma ab und transportiert die Rab-Proteine zu den entsprechenden Membrankompartimenten.^[78]

Im Gegensatz zur Myristoylierung und Isoprenylierung ist die S-Palmitoylierung eine reversible posttranslationale Modifikation.^[79] Für die Palmitoylierung ist noch keine Erkennungssequenz bekannt. Vor kurzem wurden Proteinacyltransferasen in Hefe und im menschlichen Genom identifiziert^[80-83]. Sie gehören zur Klasse der DHHC Proteine, die aus 23 Mitgliedern besteht.^[84] Durch ihre Reversibilität können viele unterschiedliche Vorgänge^[79] wie z.B. der Ras Acylierungskreislauf^[21] durch Palmitoylierung und Depalmitoylierung und somit die Membranverteilung von Proteinen reguliert werden. Die Acylproteinthioesterase (APT1) ist zurzeit das einzige Enzym, von dem bekannt ist, dass es *in vivo* Proteine depalmitoylieren kann.^[85-88]

Wie die Plasmamembranlokalisierung unterschiedlicher peripherer Membranproteine reguliert wird, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Auch die synaptische Signaltransduktion wird unter anderem durch die reversible Palmitoylierung von PSD 95 reguliert, das nur palmitoyliert zur Synapse gelangen kann.^[89-90]

Die Palmitoylierung kann Proteine in sogenannte „raft“-Domänen dirigieren. Diese Domänen besitzen einen hohen Anteil an Cholesterin, Glykosphingolipiden und Phospholipiden, die gesättigte Fettsäuren tragen. Proteine, die mit ungesättigten Fettsäuren, wie Palmitoyl, funktionalisiert sind, bevorzugen die Insertion in die „liquid-ordered“-Phase der „raft“-Domänen anstatt in die eher „liquid-disordered“-Phasen der Plasmamembran zu insertieren.^[91] Die Akkumulierung von Proteinen in „rafts“ kann

Protein-Protein- und die Protein-Lipid-Wechselwirkungen verstärken, die für die Signaltransduktion wichtig sind. Die Akkumulierung in „rafts“ und deren Bedeutung konnte z.B. für Mitglieder der Familie der SRC-Kinasen gezeigt werden.^[92-94]

Neben der Membranverankerung und Membranverteilung kann die Palmitoylierung auch Protein-Protein-Wechselwirkungen und die enzymatische Aktivität einiger Proteine regulieren. Durch Palmitoylierung von z.B. RSG16 einem GAP-Protein wird seine GTPase aktivierende Funktion stark erhöht und somit die Signaltransduktion gesteigert.^[95-96]

Einfach lipidierte Proteine besitzen unabhängig von der Art des Lipidankers keine stabile Membranverankerung, da ihre hydrophobe Wechselwirkung mit der Membran zu schwach ist.^[97-98] Sie können reversibel mit Membranen assoziieren und sind somit über viele Membrankompartimente verteilt. Um eine stabile Membranbindung einzugehen gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten für lipidierte Proteine. Nach der „two-signal hypothesis“ ist neben der irreversiblen Lipidierung durch z.B. einen Farnesylrest ein zweites Membranadressierungssignal notwendig.^[71] Dies kann entweder ein reversibel gebundener Palmitoylrest sein,^[99] oder aber eine polybasische Domäne,^[20] die das Protein durch elektrostatische Interaktionen an der Membran verankert. Dabei wird die Dissoziationsrate aus der Membran so verlangsamt, dass das Protein am Ort der Palmitoylierung „kinetisch“ stabil gebunden wird.^[71] Durch die Dynamik der Palmitoylierung kann dann die Membranverteilung reguliert werden. Für Proteine die eine polybasische Domäne besitzen ist diese Regulation nicht möglich. Ihre Membranverteilung kann durch den sogenannten „electrostatic switch“ reguliert werden. Dabei wird durch Phosphorylierung negative Ladung in die polybasische Sequenz eingebracht und die elektrostatische Membraninteraktion aufgehoben. Ein solcher Mechanismus konnte z.B. für die myristoylierte Kinase MARCKS^[74] oder die farnesylierte kleine GTPase K-Ras^[24] beobachtet werden. Wie solche Proteine nach der ribosomalen Synthese an ihre Zielmembran gelangen ohne dabei das Phänomen des „kinetic trapping“ in Anspruch nehmen zu können ist in den meisten Fällen ungeklärt. Diskutierte Möglichkeiten sind die Diffusion entlang eines elektrostatischen Gradienten oder der gerichtete Transport mit Hilfe von Transportproteinen.^[5]

Obwohl der Mechanismus des „electrostatic switch“ eine zentrale Rolle in Regulierung verschiedener Proteine spielt, konnten bis dato aufgrund fehlender lipidierte Proteinsonden, die eine polybasische Sequenz besitzen, nur eingeschränkt biophysikalische in vitro Untersuchungen gemacht werden.

Der starke Einfluss der Lipidierung auf die biologische Aktivität der entsprechenden Proteine, hat die Enzyme der posttranslationalen Modifizierungsmaschinerie,

besonders die Farnesyltransferase und Geranylgeranyltransferase zu interessanten Proteinen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe besonders gegen Krebserkrankungen werden lassen.^[100] Im besseren Verständnis der posttranslationalen Lipidierung und ihres Einflusses auf die Membranverteilung und Protein-Protein-Wechselwirkungen z.B. der kleinen GTPase Ras sieht man den Schlüssel zu neuen therapeutischen Strategien. Diese Untersuchungen werden aber Größtenteils durch das Fehlen entsprechender lipidierter Peptid- und Proteinsonden erschwert oder unmöglich gemacht. Die Entwicklung synthetischer Methoden für die Herstellung lipidierter Proteine als Werkzeuge für die Grundlagen- und Wirkstoffforschung wird daher immer wichtiger.

2.2 Synthese lipidierter Peptide

Die Synthese lipidierter Peptide spielt bei der Entwicklung neuer lipidierter Proteinsonden eine zentrale Rolle. Lipidierter Peptide sind bisher mit unterschiedlichsten Synthesestrategien hergestellt worden. Dabei wurden Synthesen an einem polymeren Träger^[101] und in Lösung^[102] realisiert. Die Lipidierung wurde sowohl nach der Peptidsynthese^[103] als auch durch lipidierte Aminosäurebausteine^[101] eingeführt. Es wurden überwiegend C-terminale Peptidsequenzen von Ras-^[101], Rab-^[104], Hedgehog-Proteinen^[105], endotheliale NO-Synthase^[106] und des Influenza Virus Hemagglutinin A^[107] synthetisiert. Diese publizierten Strategien sind auf die speziellen Anforderungen der unterschiedlichen Lipidierungsmustern ausgerichtet:

Isoprenylreste sind säurelabil und verbieten daher den Einsatz von Linkern und Schutzgruppen, die mit starken Säuren gespalten werden können. Weiterhin ist die Verwendung von Schutzgruppen, die hydrogenolytisch gespalten werden, nicht möglich.

Reversible Thioester Verknüpfungen von z.B. Palmitoylsäure mit einer Cysteinseitenkette sind basenlabil und können durch Nukleophile gespalten werden. Dies ist besonders im Zusammenspiel mit der häufig auftretenden Carboxymethylierung des C-Terminus von isoprenylierten Peptiden ein Problem. Die Carboxymethylierung wird in den meisten Fällen durch nukleophile Abspaltung vom polymeren Träger eingeführt.

Weiterhin können solche Thioester an einem ungeschützten N-terminalen Cystein eine S-, N-Acyl Wanderung durchlaufen und somit eine stabile Amidbindung ausbilden (Abbildung 6).

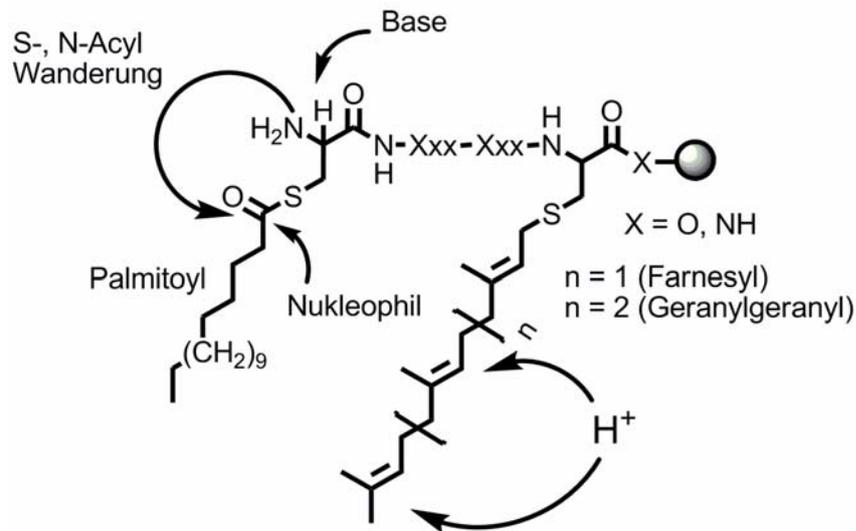


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Nebenreaktionen, die während der Synthese lipidierter Peptide auftreten können.

Für die Synthese farnesylierter, palmitoylierter und carboxymethylierter Peptide, wie z.B. der C-Terminus von N-Ras, wird bevorzugt der sogenannte Hydrazid-Anker als Verknüpfung zur festen Phase verwendet.^[108] Dieser Linker kann zu einem Acyldiazon oxidiert und dann mit Nukleophilen, wie z.B. Wasser, Methanol und Aminen abgespalten werden.^[109] Er ist orthogonal zu den Urethan-Schutzgruppen Fmoc, Boc und Alloc und die Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger erfolgt ohne auftretende Racemisierung. Besonders Lysinseitenketten müssen während der Abspaltung geschützt werden um Oligomerisierungen oder Zyklisierungen zu verhindern. Sie können erst nach der Abspaltung in Lösung entschützt werden. Ein weiterer Linker, der für die Synthese von palmitoylierten und farnesylierten Peptiden verwendet werden kann, ist der sogenannte Ellmann Sulfonamid-Linker.^[110] Er ist sowohl Säure- und Basenstabil, kann durch Alkylierung aktiviert und mit Methanol abgespalten werden.

Beide Linkersysteme sind für die Synthese von polybasischen lipidierten Sequenzen, wie den C-Terminus von K-Ras4B, nicht geeignet. Für diese Synthese wird der Trityl-Linker verwendet.^[111-112] Das Peptid wird entweder über die Carbonsäure der C-terminalen Aminosäure, meistens ein farnesyliertes Cystein, oder über die Seitenkette eines Lysins in der Nähe des C-Terminus an den polymeren Träger gebunden. Letzteres ermöglicht die C-terminale Einführung von z.B. carboxymethylierten, farnesylierten Cysteinderivaten. Die Synthese in N-terminale Richtung kann dann z.B. mit einer Kombination aus Fmoc-, Trityl und Alloc-Schutzgruppen durchgeführt werden. Die geschützten Lysin- und Argininseitenketten können dann Pd(0)-katalysiert nach Abschluss der Peptidsynthese mit einem entsprechenden Nukleophil

entschützt werden. Unter milden sauren Bedingungen, die orthogonal zu den verwendeten Isoprenylresten sind, können dann die verbleibenden Trityl-Schutzgruppen und das Peptid vom polymeren Träger abgespalten werden.

Neben den durch die Lipidreste bedingten Einschränkungen ist die Synthese der meisten lipidierten Peptidsequenzen durch teilweise sehr niedrige Kupplungsausbeuten erschwert. Dies ist auf die unvollständige Entschützung des N-Terminus und/oder die unvollständige Kupplung der nachfolgenden Aminosäure zurückzuführen. Ein offensichtlicher Grund dafür, ist der sterische Anspruch einiger Aminosäuren, der den reaktiven N-Terminus abschirmt. Ab Kettenlängen von 10 Aminosäuren kann es außerdem zur Ausbildung von sekundären Strukturen wie α -Helices oder β -Faltblätter kommen, die somit eine zusätzliche sterische Hinderung darstellen.^[113-114] Durch polare Seitenkette, wie z.B. in polybasischen Sequenzen, kann es zu einer Vernetzung durch Wasserstoffbrücken-Bindungen sowohl zwischen den einzelnen Peptidketten, als auch zwischen Peptid und polymeren Träger kommen.^[114] Diese Quervernetzung schränken die Quelleigenschaften des polymeren Trägers ein und reduzieren die Kupplungsausbeuten. Diesen Phänomenen kann durch den Einsatz von polaren Lösungsmitteln, reaktiveren Kupplungsreagentien oder chaotropen Salzen entgegengewirkt werden.^[113-115]

Ein Beispiel für die Auswirkung dieser Effekte z.B. bei polybasischen Sequenzen ist die erste Synthese des C-Terminus von K-Ras4B, die trotz zwei- bis vierfacher Kupplung der einzelnen Aminosäuren nur ein Ausbeute von 0.7% ergab.^[116]

Obwohl es in der Literatur viele Beispiele für die Synthese lipidierte und/oder polybasischer Peptide mit moderaten bis guten Ausbeuten gibt, bleibt die Synthese solcher Peptide aber aufgrund der oben genannten Einschränkungen eine Herausforderung. Sowohl die Synthesestrategie als auch die Synthesebedingungen müssen jedes Mal neu angepasst und evaluiert werden, auch eine Automatisierung war daher noch nicht möglich. Auch die Aufarbeitung solcher Peptide wird durch ihre Lipidierung beeinträchtigt. Besonders die Reinigung durch reversed phase HPLC, wie sie für Peptide üblich ist, ist durch ihre eingeschränkte Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln erschwert.

Somit ist die Lipopeptidsynthese weit davon entfernt ein ähnlich standardisiertes Werkzeug zu werden wie es die Festphasenpeptidsynthese heute schon darstellt.

2.3 *Synthese lipidierter Proteine*

Die Verwendung posttranslational modifizierter Proteine ermöglicht nicht nur die Untersuchung von Wechselwirkungen, die von diesen Modifikationen direkt abhängig sind - wie z.B. Protein-Protein Interaktionen oder Protein-Membran Wechselwirkungen, sondern sie erlaubt auch eine bessere Übertragbarkeit von biochemischen *in vitro* Ergebnissen in die zelluläre Umgebung.^[117] Posttranslationale Modifizierung von Proteinen wie Phosphorylierung, Glykosylierung und Lipidierung treten hauptsächlich in eukaryotischen Organismen auf. Daher ist die Expression solcher modifizierter Proteine in prokaryotischen Expressionssystemen, wie *Escherichia coli* (*E. coli*), sehr schwierig. Durch genetische Methoden, wie der Koexpression spezieller Enzyme, z.B. der N-Myristoyltransferase ist es aber möglich, lipidierte Proteine in *E. coli* zu exprimieren.^[118] Eukaryotische Systeme, die für die Expression posttranslational modifizierter Proteine verwendet werden können, sind Hefe-Zellen^[119] und *Dictyostelium discoideum*^[120-121]. Es besteht ferner die Möglichkeit lipidierte Proteine aus Gewebe oder Membranfraktionen von Insekten zu extrahieren. Dies wurde für die Isolierung von lipidierten Rab Proteinen durchgeführt, bei der Insekten mit einem Baculovirus infiziert wurden, der ein Rab-Gen trug.^[122-123]

Die angesprochenen Methoden führen bei hohem Kosten- und Zeitaufwand nur zu sehr geringen Ausbeuten. Die Einführung verschiedener Lipidreste oder sogar nicht-natürlicher Funktionalitäten ist mit solchen Systemen beinahe unmöglich.^[124] Zurzeit werden zwei unterschiedliche Ansätze in der Forschung verfolgt, um die Synthese posttranslational modifizierter Proteine besonders lipidierter Proteine zu bewerkstelligen. Einerseits wird versucht Lipidreste mittels lipidierender Enzyme *in vitro* einzubringen, andererseits werden Ligationstechniken angewendet, bei denen ein verkürztes, durch Expression hergestelltes Protein mit einem synthetischen lipidierten Peptid verknüpft wird.

2.3.1 *Synthese lipidierter Proteine mittels enzymvermittelter Lipidierung*

Durch die Verwendung von lipidierenden Enzymen in *in vitro* Systemen ist es möglich, sowohl Peptide als auch Proteine regioselektiv zu lipidieren.^[125-126] Die Substrate solcher lipidierender Enzyme wie der Farnesyltransferase und der Geranylgeranyltransferase I und II sind Prenylpyrophosphate wie Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat. Aufgrund der großen Substrattoleranz in Bezug auf das zu lipidierende Protein und das zu übertragende Prenylpyrophosphat^[127-131] konnten

unterschiedliche, auch mit nicht-natürlichen Prenylresten lipidierte Ras-Proteine synthetisiert werden. Mit diesen Proteinen war es möglich, den Mechanismus der FTase aufzuklären.^[127-128, 131]

Die Entwicklung eines neuen Expressionssystems für GGTase II ermöglichte einen effizienten Zugang zu prenylierten Rab Proteinen.^[132] Dabei wurde die breite Substrattoleranz der GGTase II ausgenutzt, um z.B. fluoreszierende Prenylreste enzymatisch auf Rab7 zu übertragen und den Mechanismus der Prenylierung aufzuklären. Neben der schon erwähnten GGTase II ist ein weiteres Protein, das REP (rab escort protein), für die erfolgreiche Prenylierung notwendig.^[133-134]

Durch die Möglichkeit, rekombinante Proteinacyltransferasen zu exprimieren und aufzureinigen, kann unter Umständen auch eine weitere Klasse der Lipidierungen, die Acylierung von Thiolen, Alkoholen oder Aminen für enzymvermittelte Proteinlipidierungsreaktionen, zugänglich gemacht werden.^[135]

Obwohl eine Vielzahl von Beispielen in der Literatur zur enzymatischen Lipidierung posttranslationaler Proteine beschrieben ist, bleibt die Synthese besonders mehrfach modifizierter Proteine immer noch sehr anspruchsvoll. Diese Methodik ermöglicht nur die Einführung nicht-natürlicher Funktionalitäten im Bereich des Prenylrests und ist durch die Substrattoleranz der entsprechenden Enzyme und die Regioselektivität der Übertragungsreaktion limitiert.

2.3.2 Ligationstechniken für die Synthese lipidierter Proteine

Die Nachteile der enzymvermittelten *in vitro* Synthese (Regioselektivität der Reaktion, Einschränkungen durch Substrattoleranz) lipidierter Proteine können durch unterschiedliche Ligationstechniken, bei der ein entsprechend verkürztes Protein entweder unter Ausbildung einer Amidbindung oder einer nicht-natürlichen Bindung mit einem synthetischen Peptid reagiert, überwunden werden. Somit können maßgeschneiderte Proteinsonden, die z.B. Spin- oder Photolabel tragen, synthetisiert werden und für die Aufklärung der Rolle posttranslationaler Modifikationen z.B. in der Signaltransduktion verwendet werden.^[136-144]

2.3.2.1 Expressed Protein Ligation

Die Expressed Protein Ligation stellt eine Weiterentwicklung der von KENT entwickelten Native Chemical Ligation dar. Die Native Chemical Ligation ermöglicht die Ligation zweier ungeschützter Peptide durch die Reaktion eines C-terminalen Thioesters und eines N-terminalen Cysteins des zweiten Peptides. Durch diese

chemoselektive Ligationsreaktion wurde die Begrenzung der Peptidsynthese auf kleinere Proteindomänen, bestehend aus ca. 50 Aminosäuren, aufgehoben.^[145] Die Kombination der Native Chemical Ligation mit der Synthese rekombinanter Proteine führte dann schließlich zur Expressed Protein Ligation, bei der ein C-terminaler Proteinthioester mit dem N-terminalen Cystein eines Peptides unter Ausbildung einer Amidbindung reagiert.^[136, 146-147]

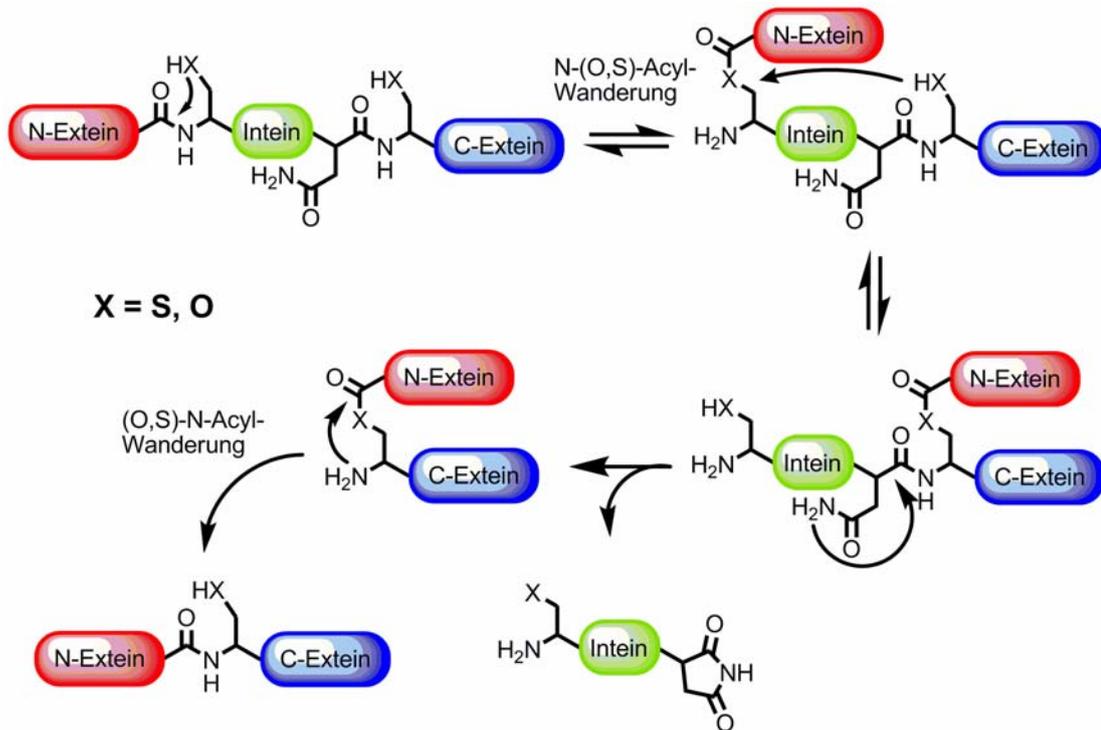


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Mechanismus des Proteinsplittings. Einer N-→S-/O-Acylwanderung an einer N-terminal des Inteins gelegenen Aminosäure folgt eine (Thio)-Umesterung mit einer Aminosäure C-terminal des Inteins, dabei entsteht ein verzweigtes Proteinkonstrukt. Das C-terminale Asparagin des Inteins spaltet die C-terminale Intein-Extein-Bindung indem es ein Succinimid bildet. Die fusionierten Exteine sind nach einer S-/O-→N-Acylwanderung über eine Amidbindung miteinander verknüpft.

Der Proteinthioester kann durch genetische Modifikation des Proteinsplittings erhalten werden. Beim Proteinsplicing wird ein Proteinsegment, das sogenannte Intein, das von zwei speziellen Proteinsegmenten, den sogenannten Exteinen, flankiert wird, autokatalytisch herausgeschnitten (Abbildung 7).^[148] Dieser Vorgang beginnt mit einer N-→S-/O-Acyl-Wanderung am N-terminalen Rest des Inteins. Der entstandene (Thio-)Ester wird durch ein Cystein/Serin, das C-terminal dem Intein benachbart ist, in einen weiteren (Thio-)Ester umgewandelt und so die beiden Exteine zusammengeführt. Das dadurch verzweigte Proteinkonstrukt wird durch einen Asparaginrest am

C-Terminus des Inteins gespalten und das Intein herausgeschnitten. Die beiden über einen (Thio-)Ester verknüpften Exteine durchlaufen eine S-,O-→N-Acyl-Wanderung und sind dann durch eine Amidbindung miteinander verknüpft

Durch die genetische Manipulation des Inteins kann die Splicing-Reaktion auf der Stufe des ersten intermediären Thioesters stabilisiert werden und dann durch ein externes Thiolreagenz abgefangen werden. Diese Modifizierung führte schließlich zur Entwicklung des IMPACT®-Systems (intein-mediated purification with an affinity chitin-binding tag).

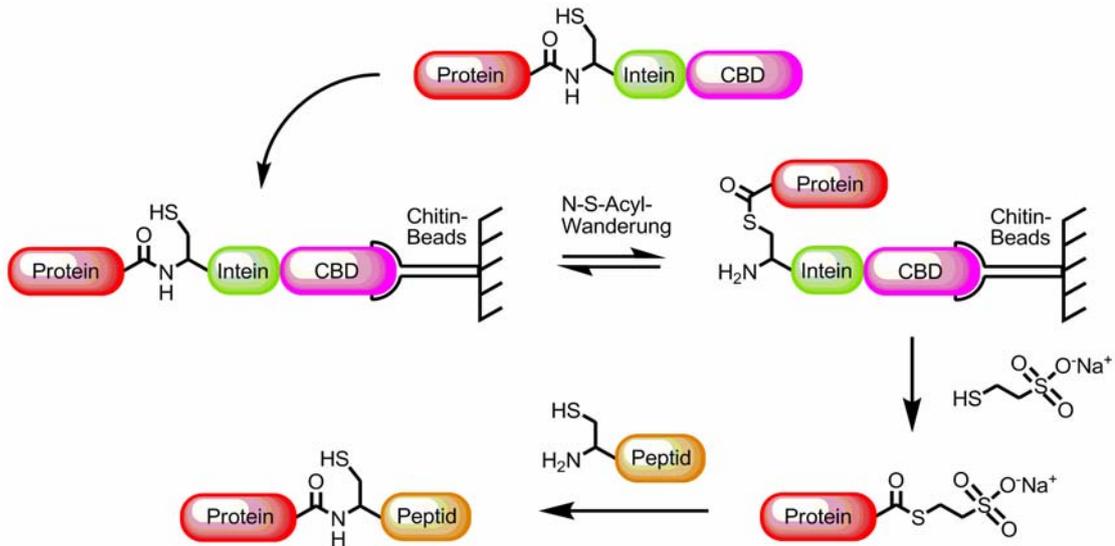


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Expressed Protein Ligation. Das in den IMPACT® Vektor klonierte Protein wird als Intein-CBD-Konstrukt exprimiert, mit Chitin-Beads aus dem Zelllysat isoliert und der bei der inteinvermittelten Splicingreaktion entstandene Thioester mit einem externen Thiol (Natrium-2-sulfanylethansulfonat, Mesna) als Protein-Mesna-Thioester von der Säule gespült. Der Proteinthioester wird mit einem Peptid, das ein N-terminales Cystein trägt, unter Ausbildung einer Amidbindung umgesetzt. CBD: chitin binding domain.

Der IMPACT® Vektor erlaubt durch die Verwendung einer „Chitin-Binding-Domain“ (CBD), die anstatt eines N-terminalen Exteins mit einem modifizierten Intein fusioniert ist, die Expression und Aufreinigung eines Proteinthioesters. Nach der Klonierung des entsprechenden Proteins in den IMPACT® Vektor und Expression des Protein-Intein-CBD-Konstruktes kann das rekombinante Protein aus dem Zelllysat an einer Chitinsäule isoliert werden. Die modifizierte Intein-domäne führt unter Ausbildung eines stabilen Thioesters nur den ersten Schritt der Spleißreaktion aus. Der dabei entstandene Thioester kann durch ein externes Thiolreagenz umgeestert werden und somit das Protein als Thioester von der Chitin-Säule gespült werden.

In einer Lignationsreaktion wird dieser Proteinthioester mit einem synthetischen Peptid, das ein N-terminales Cystein trägt, umgesetzt und es entsteht ein Thioester zwischen dem C-Terminus des Proteins und dem N-Terminus des entsprechenden Peptides. In einem zweiten Schritt bildet sich dann durch eine intramolekularen S-, N-Acyl Wanderung eine stabile Amidbindung aus (Abbildung 8).

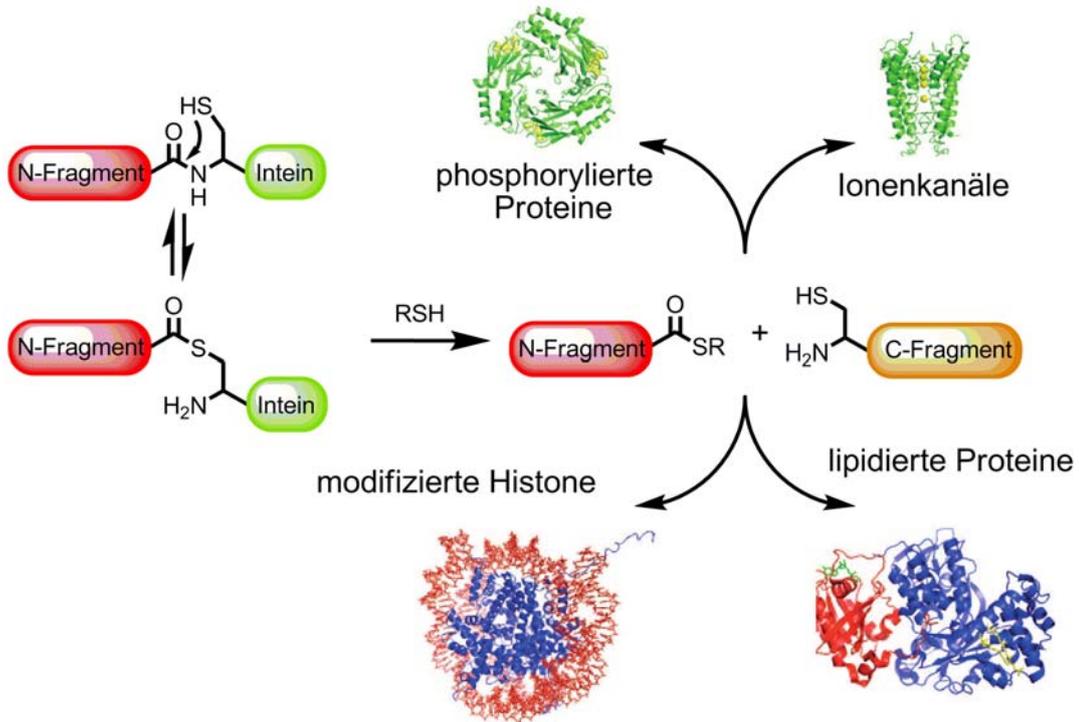


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Mechanismus der Expressed Protein Ligation. Das N-terminale Protein Fragment kann durch modifiziertes Proteinsplicing (Abbildung 8) in einen Thioester überführt werden. Das C-terminale Fragment wird in einer Native Chemical Ligation mit dem N-terminalen Fragment ligiert. Durch die Expressed Protein Ligation konnte eine Vielzahl unterschiedlich modifizierter Proteine synthetisiert werden. R = Alkyl, Phenyl, Benzyl, CH₂CH₂SO₃Na.

Die Expressed Protein Ligation konnte bis jetzt für eine Vielzahl von Anwendungen genutzt werden, u.a. für die Einführung reaktiver Gruppen in Proteine zwecks Evaluierung neuer Lignationsmethoden^[149-150] oder zur Durchführung von Oberflächen-^[151], Polymer-^[152], Biopolymer-^[153] und Nanopartikel-Protein-Ligationen^[154]. Weiterhin konnten Proteinoligomere^[155] oder -sonden^[156-157] für die Aufklärung und Beeinflussung zellulärer Vorgänge synthetisiert werden (Abbildung 9).

Interessantes Beispiele für die Möglichkeiten, die sich durch die Verwendung der Expressed Protein Ligation ergeben, sind die Synthese von geranylgeranylierten Rab-Proteinen^[158-160], die Synthese von Proteinen, die mit einem Glycosylphosphatidyl-

inositol Anker^[161-162] (GPI-Anker) versehen sind und die Synthese einer H-Ras/ K-Ras-Chimäre^[112]. Dieses Hybridprotein besitzt die globuläre Proteindomäne von H-Ras und die polybasische C-terminale Sequenz von K-Ras4B. Solche Chimären können aber z.B. in biophysikalischen Untersuchungen nur ein unscharfes Bild der Realität widerspiegeln. Um ein genaues Bild von z.B. grundlegenden biophysikalischen Eigenschaften von K-Ras4B, das eine zentrale Rolle in der Entstehung von Krebs spielt, zu zeichnen, werden posttranslational modifizierte K-Ras4B-Proteine benötigt.

2.3.2.2 Maleinimid Ligation

Bei der Maleinimid (MIC) Ligation reagiert das Thiol eines Cysteins mit einem Michael-Akzeptor, in den meisten Fällen ist dies ein Maleinimid. Dabei ist es häufig das C-terminale Cystein eines Proteins, das mit einem MIC-modifizierten Peptid reagiert.

Als Ergebnis der Ligation werden Peptid und Protein durch eine Thioetherbindung kovalent miteinander verknüpft. Der Nachteil dieser nicht-nativen Verknüpfung wird durch die Bioorthogonalität und Chemoselektivität der Michael-Addition wieder aufgewogen. Um Regioselektivität zu erlangen, darf auf der Oberfläche des Proteins maximal ein Cystein für die Ligationsreaktion zugänglich sein. Weiterhin wird die Reaktion unter neutralen Bedingungen durchgeführt, um zu verhindern, dass Amine an den Micheal-Akzeptor addieren.

Die MIC-Ligation erlaubt es unterschiedlichste posttranslationale Modifikationen wie Lipidreste in semisynthetische Proteine einzuführen. Diese ligationsvermittelte Lipidierung ermöglicht in den meisten Fällen eine effiziente Aufarbeitung des gekoppelten Proteins durch eine sogenannte Triton X-114 Extraktion.^[163] Bei 30°C kann das ligierte lipidierte Protein, das sich in der Triton X-114-Phase löst, vom nicht ligierten Protein in der Wasser-Phase getrennt werden.

Mit Hilfe der MIC-Ligation konnte die Synthese posttranslational modifizierter N-Ras-Proteine durchgeführt werden. Diese äußerst wertvollen Proteinsonden konnten für unterschiedlichste Fragestellungen eingesetzt werden und somit tiefere Einblicke in die Membranverteilung unterschiedlich lipidierter N-Ras-Proteine geben.^[164-166] Die Struktur des lipidierten C-Terminus und seinen Einfluss auf die Membranorientierung des N-Ras-Proteins konnten mittels NMR-Techniken genauer untersucht werden^[167-171]. Weiterhin wurden tiefere Einblicke in den sogenannten Ras-Acylierungskreislauf gewonnen.^[21]

3. Ziel der Arbeit

3.1 Semisynthetische K-Ras4B Proteine

Für ein besseres Verständnis der Onkogenese und ihren zugrundeliegenden Mechanismen und Signalwegen sind posttranslational modifizierte semisynthetische Ras-Proteinsonden unabdingbar. Für N-Ras konnten solche Sonden mit dem Einsatz der MIC-Ligations-Technik hergestellt werden.^[172] Diese für N-Ras-Proteine sehr effiziente und selektive Methode konnte für K-Ras-Proteine aufgrund ihres polybasischen C-Terminus nicht angewendet werden.

In dieser Arbeit sollte in einer Kombination aus molekularbiologischen Techniken und organischer Synthese eine Strategie entwickelt werden, die es ermöglichte sowohl K-Ras4B- als auch H-Ras-Proteine zu synthetisieren und somit die Lücke in der Verfügbarkeit semisynthetischer Ras-Proteine zu schließen.

Dabei soll ein besonderes Augenmerk auf die polybasische Sequenz des C-Terminus und das farnesylierte, carboxymethylierte Cystein von K-Ras4B gelegt werden (Abbildung 10).

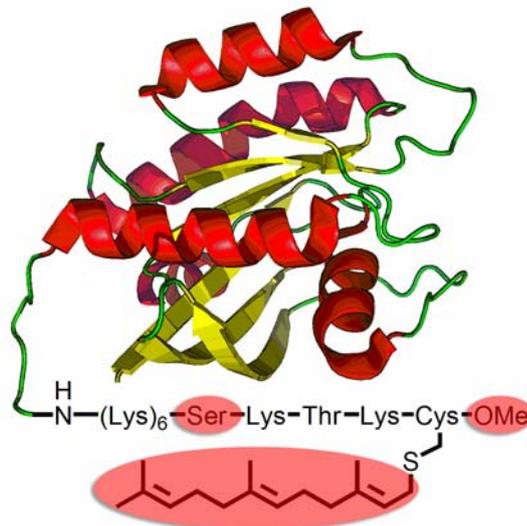


Abbildung 10: Schematische Darstellung von posttranslational modifiziertem K-Ras4B. Die für diese Arbeit interessanten Strukturmodule, die durch die Synthese von Analoga variiert werden sollen, wie das Serin des C-Terminus, das phosphoryliert werden kann oder das farnesylierte, carboxymethylierte Cystein, sind rot unterlegt.

Die C-terminalen Peptidsequenzen von K-Ras4B und H-Ras sollen mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden und anschließend mit einem verkürzten

K-Ras4B-/H-Ras-Protein verknüpft werden. Für diese Ligationen sollte die Expressed Protein Ligation verwendet werden.^[136]

Eine solche Strategie könnte einen effizienten Zugang zu unterschiedlichen K-Ras4B Analoga bieten, die sowohl auf ihre biologische Aktivität in zellulären Systemen als auch auf ihre biophysikalischen Eigenschaften untersucht werden sollten.

Durch z.B. die Synthese eines phosphorylierten K-Ras4B Analogons, eines Analogons ohne Carboxymethylierung oder ohne Farnesylrest sollte in Oberflächenplasmonenresonanz-Experimenten ein genaueres Bild über die Assoziations- und Dissoziationsvorgänge an künstlichen Membransystemen erhalten werden. Dabei soll die Membranbindung der einzelnen Analoga zu ungeladenen und unterschiedlich negativ geladenen Modelmembranen untersucht werden. Dadurch könnte der sogenannte „elektrostatic switch“, der durch die Phosphorylierung des C-Terminus von K-Ras4B ausgelöst wird, biophysikalisch quantitativ untersucht werden.

Durch diese Arbeiten könnten Rückschlüsse auf die Frage gezogen werden, ob K-Ras4B einen aktiven Transportprozess, wie z.B. ein Transportprotein, benötigt, um nach der posttranslationalen Modifizierung am endoplasmatischen Retikulum an die Innenseite der Plasmamembran zu gelangen oder ob ein diffusionskontrollierter Prozess ausreichend ist.^[5]

Ein mögliches Transportprotein ist die δ -Untereinheit der Phosphodiesterase6 (PDE δ). Für die Interaktion beider gibt es bisher nur *in vivo* Studien, die noch kein genaues Bild in Bezug auf die Spezifität und die entsprechenden strukturellen Voraussetzungen eines möglichen PDE δ -K-Ras4B-Komplexes zeichnen konnten.^[173]

Für die *in vitro* Charakterisierung des PDE δ -K-Ras4B-Komplexes sollten unterschiedliche fluoreszenzmarkierte C-terminale K-Ras4B-Peptide und entsprechend modifiziertes semisynthetisches K-Ras4B hergestellt werden. Mit ihnen sollten die strukturellen Erfordernisse des Komplexes mittels Fluoreszenzpolarisationsassay untersucht werden.

3.2 Der Protein Acylierungskreislauf

Durch den Einsatz semisynthetischer N-Ras-Proteine konnte gezeigt werden, dass die Palmitoylierung von N-Ras am Golgi-Apparat stattfindet und weder stereospezifisch ist noch eine auf α -Aminosäuren basierenden C-Terminus benötigt.^[174] Aufgrund der fehlenden Spezifität dieser Palmitoylierungsmaschinerie stellt sich die Frage, ob nur die entsprechenden farnesylierten Ras-Proteine oder auch etwaige andere Proteine mit alternativen Membranankersystemen am Golgi-

Apparat palmitoyliert werden und dort in den Kreislauf eintreten. Und ob der Golgi-Apparat unter Umständen das einzige Membrankompartiment darstellt an dem Proteine palmitoyliert werden können. Bis jetzt wird in der Literatur davon ausgegangen, dass die Palmitoylierung von Proteinen an unterschiedlichen Membrankompartimenten, wie der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen Retikulum stattfindet.^[79]

Um diese Frage zu beantworten, sollten sowohl Proteine die N-myristoyliert und palmitoyliert sind als auch Proteine die zweifach palmitoyliert sind, in Bezug auf das Membrankompartiment an dem ihre Palmitoylierung stattfindet, untersucht werden. Dafür sollen die entsprechenden N-terminalen myristoylierten Peptide der Proteine G α i, Fyn, Yes und der nicht-lipidierte N-Terminus von Gap43 synthetisiert werden und mit Hilfe der MIC-Ligation mit der globulären Proteindomäne von N-Ras und grün fluoreszierendem Protein (eGFP) verknüpft werden. Zusätzlich sollten Serinanaloga, bei denen die palmitoylierbaren Cysteine durch Serine ausgetauscht wurden, als Negativkontrolle hergestellt werden. Durch diese Negativkontrollen kann die regio-spezifische Palmitoylierung an den ausgetauschten Cysteinen nachgewiesen werden. Die Proteine wurden ausgewählt, da in vorangegangene Studien von Dr. ROCKS gezeigt werden konnte, dass Konstrukte mit dem N-Terminus von G α i und Gap43 an der Plasmamembran und am Golgi-Apparat lokalisieren und zwischen beiden Kompartimenten austauschen können. Ihr Palmitoylierungsort konnte aufgrund fehlender semisynthetischer Proteinsonden nicht nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde für Fyn die Palmitoylierung an der Plasmamembran nachgewiesen.^[175] Diese Untersuchungen verwendeten Methoden mit einer Zeitauflösung im Bereich von 5-10 min, so dass wahrscheinlich nur der Gleichgewichtszustand der Membranverteilung und nicht der Ort der Palmitoylierung nachgewiesen werden konnte.

Durch eine Kombination von Mikroinjektion der semisynthetischen Proteinsonden und „Life-time imaging“, sollte in einer Kooperation mit Prof. Dr. BASTIAENS der Ort der Palmitoylierung durch das sogenannte „kinetic-trapping“ bestimmt werden. Auch die Kinetik der entsprechenden Palmitoylierungsreaktion sollte gemessen und mit den schon für N-Ras bekannten Reaktionsgeschwindigkeiten verglichen werden.

In der Gesamtheit sollten die ausgewählten Proteinsonden die unterschiedlichen Membranankersysteme (myristoyliert, palmitoyliert - farnesyliert, palmitoyliert - nur palmitoyliert) repräsentieren und mit ihnen sollte untersucht werden ob die Palmitoylierung peripherer Membranproteine ausschließlich am Golgi-Apparat stattfindet.

4. Spezieller Teil

4.1 Synthese von K-Ras4B Proteinen

4.1.1 Strategie für die Synthese der K-Ras4B Proteine

K-Ras4B sollte semisynthetisch durch die „Expressed Protein Ligation“ hergestellt werden. Ein C-terminal verkürztes K-Ras4B Δ 1-174-Protein sollte durch Klonierung in den IMPACT® Vektor als Protein-Mesna-Thioester exprimiert und der fehlende C-Terminus mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden (Abbildung 11).

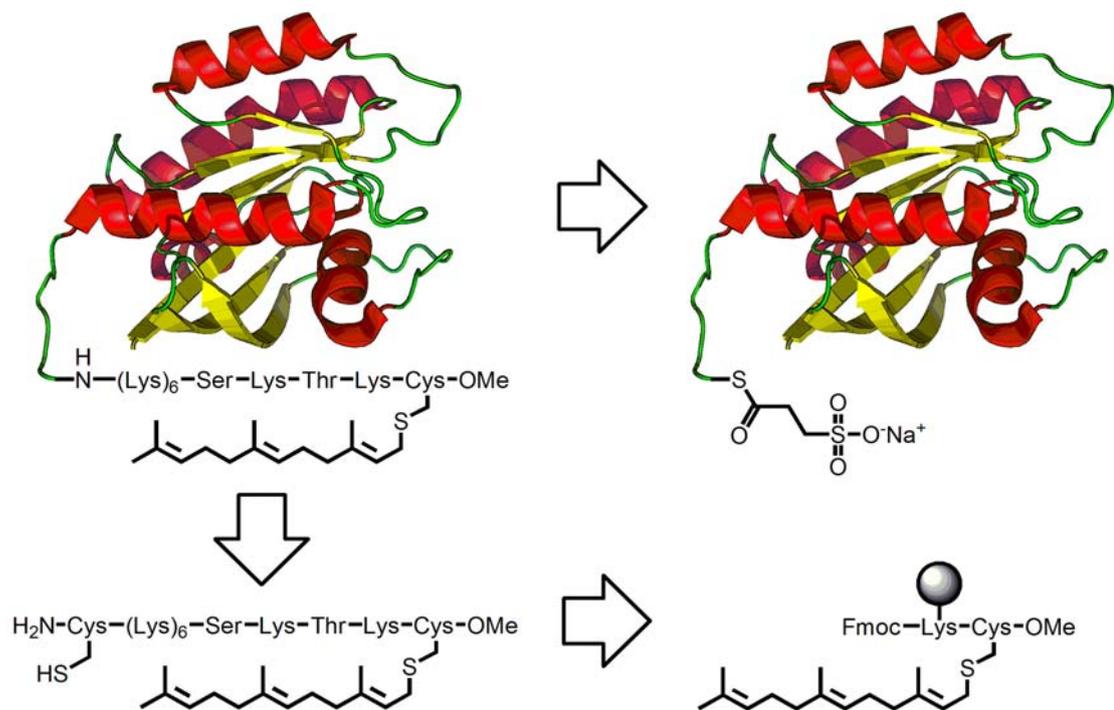


Abbildung 11: Retrosynthetische Analyse des K-Ras4B-Proteins. Das Protein wird retrosynthetisch in den K-Ras4B Δ 1-174-Mesna-Thioester und das C-terminale K-Ras4B Peptid (175-186), das N-terminal ein zusätzliches Cystein für die „Expressed Protein Ligation“ trägt, gespalten. Das Peptid kann durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden.

Da der C-Terminus von K-Ras4B kein Cystein besitzt, muss dieses zusätzlich N-terminal in das Peptid eingeführt werden. Die Schnittstelle wird so gewählt, dass das zu synthetisierende Dodecapeptid sowohl aus der polybasischen Sequenz als auch aus dem farnesylierten und carboxymethylierten Cystein besteht. Beide Strukturelemente sind für die Membranaffinität und die zu untersuchende Interaktion

mit lipidsensitiven Partnern von großer Bedeutung. Die gewählte Schnittstelle erlaubt es nun, diese wichtigen Strukturelemente durch den Einbau z.B. phosphorylierter Aminosäuren zu modifizieren.

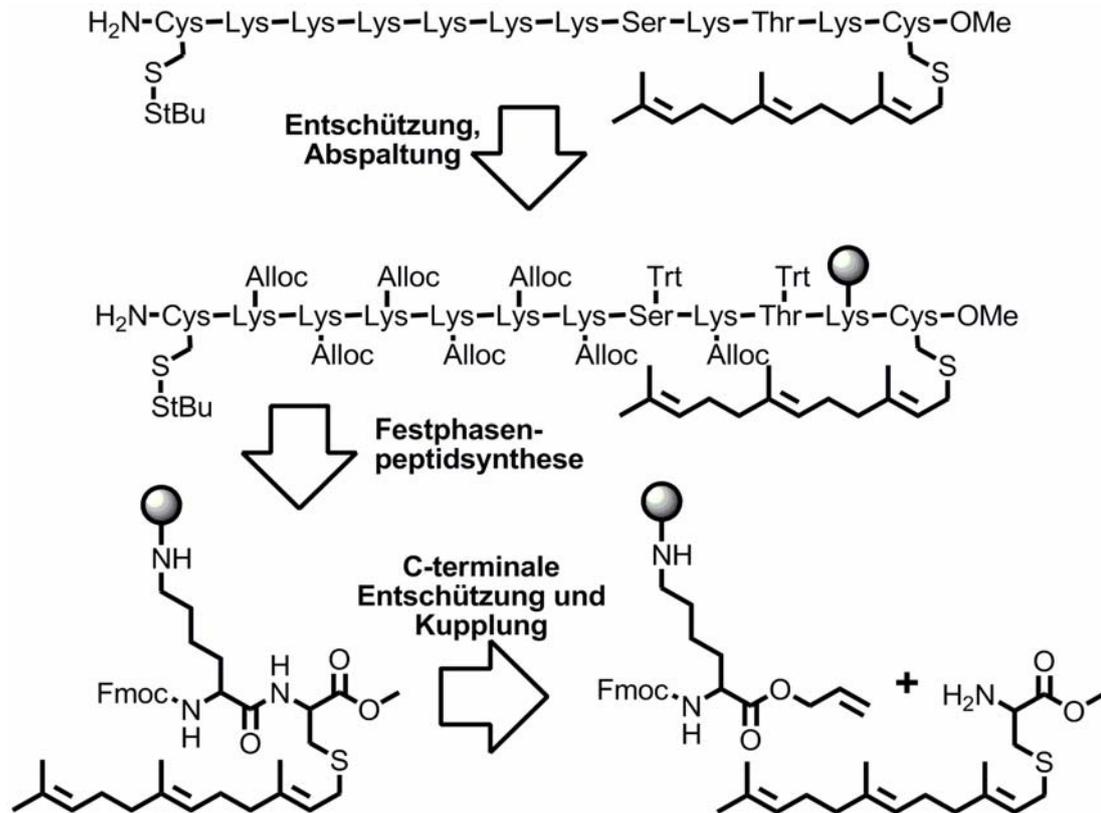


Abbildung 12: Retrosynthetische Analyse des C-terminalen K-Ras4B Peptids. Das Peptid wird über die Seitenkette der vorletzten Aminosäure, einem Lysin am polymeren Träger immobilisiert. Nach C-terminaler O-Allyl-Entschützung wird das farnesylierte, carboxymethylierte Cystein eingeführt und das Peptid mittels Festphasenpeptidsynthese in N-terminaler Richtung aufgebaut.

Aufgrund der Carboxymethylierung des C-Terminus sollte das Peptid über die Seitenkette der vorletzten Aminosäure an der festen Phase immobilisiert werden. Dieses Vorgehen erlaubt dann die Funktionalisierung des C-Terminus mit unterschiedlichsten carboxymethylierten Aminosäuren. Nach dem Aufbau des modifizierten C-Terminus sollte die Synthese in N-terminaler Richtung mit modifizierter Fmoc-Strategie erfolgen (Abbildung 12).^[112, 176] Für Derivate, die keine Carboxymethylierung besitzen, kann das Peptid über die Carbonsäure der letzten C-terminalen Aminosäure an der festen Phase immobilisiert werden.

Für die Synthese sind Fmoc geschützte Aminosäuren, deren Seitenkettenfunktionen wie folgt geschützt sind, vorgesehen: Für Alkohole wird die säurelabile Trityl-, für

Amine die Alloc-Schutzgruppe, die Pd-katalysiert abgespalten werden kann, und für Thiole die reaktiv zu spaltende S-tert-Butylthio Schutzgruppe (S-tBu) gewählt.

Nachdem das Peptid an der festen Phase aufgebaut worden ist, sollten die Amine palladiumkatalysiert unter basischen Bedingungen entschützt und sowohl die Trityl-Schutzgruppen als auch das Peptid vom polymeren Träger säurekatalysiert abgespalten werden.

4.1.2 Synthese der Aminosäurebausteine

Zur Immobilisierung der ersten Aminosäure am 2-Chlorotrityl-Linker wurde ein N^{α} -Fmoc-geschützter L-Lysinallylester (Fmoc-Lys(Boc)-OAll) (**1**) und für die Synthese in C-terminaler Richtung ein S-farnesylierter L-Cysteinmethylester (Cys(Far)-OMe) (**2**) benötigt. Für die Synthese von K-Ras4B Sequenzen ohne Carboxymethylierung war ein N^{α} -Fmoc-geschütztes S-farnesyliertes L-Cystein (Fmoc-Cys(Far)) (**3**) erforderlich.

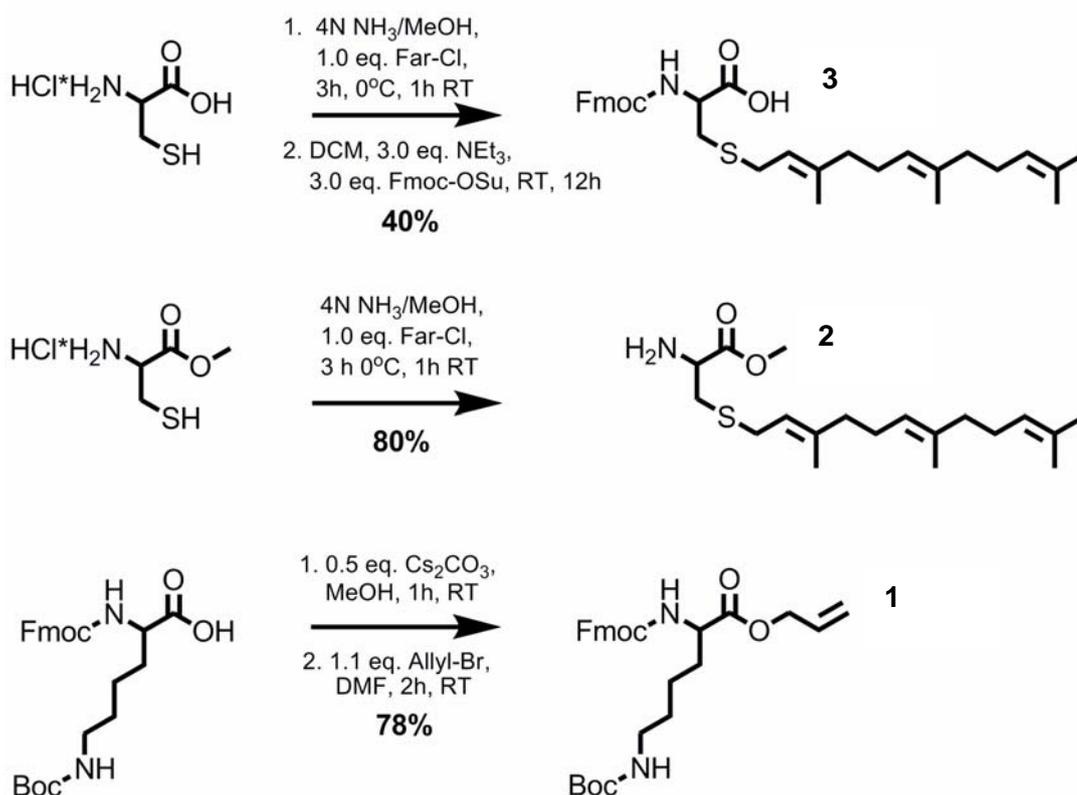


Abbildung 13: Synthese der für die Herstellung von K-Ras4B Peptiden essentiellen Building Blocks (Cys(Far)-OMe) **2**, Fmoc-Lys(Boc)-OAll **1** sowie Herstellung des für spätere Analoga notwendigen Building Blocks Fmoc-Cys(Far) **3**.

Die Prenylierung von L-Cystein oder L-Cysteinmethylester wurde nach einer modifizierten Vorschrift von BROWN *et al.*^[177] mit Farnesylchlorid in 4N Ammoniaklösung in

Methanol durchgeführt. Der Methylester **2** konnte dabei in einer Ausbeute von 80% isoliert werden. Für die Synthese von Fmoc-Cys(Far) wurde L-Cystein nach entsprechendem Protokoll mit Farnesylchlorid umgesetzt und das Rohprodukt ohne weitere Reinigung mit Fmoc-Succinimid unter Zusatz von Triethylamin mit 40% Ausbeute zum N^{α} -Fmoc-geschützten Derivat **3** umgesetzt.^[101]

Ausgehend von N^{α} -Fmoc- N^{ϵ} -Boc-geschütztem L-Lysin wurde die Carboxylfunktion durch Reaktion ihres Cäsiumsalzes mit Allylbromid in den Allylester **1** überführt (Abbildung **13**).^[178]

Für die Synthese fluoreszenzmarkierter K-Ras4B Proteine wurde ein N^{α} -Fmoc-geschütztes L-Lysin mit einer dansylmodifizierten Seitenkette **4** synthetisiert. Ausgehend von N^{α} -Fmoc- N^{ϵ} -Boc-geschütztem L-Lysin wurde die Boc-Schutzgruppe der Lysinseitenkette mit einem 1:1 DCM/TFA Gemisch entfernt und im Hochvakuum für 12h getrocknet. Das Rohprodukt wurde direkt mit Dansylchlorid und Triethylamin in DCM umgesetzt und nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 60% erhalten (Abbildung **14**).

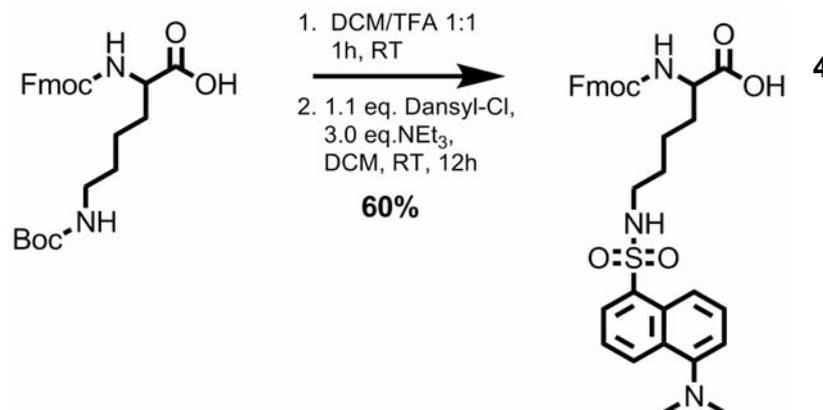


Abbildung 14: Synthese des fluoreszierenden Fmoc-Lys(Dansyl) **4**, das für die Darstellung von fluoreszenzmarkiertem K-Ras4B eingesetzt wurde.

Für die Synthese eines unfarnesylierten K-Ras4B Proteins, das anstatt eines farnesylierten Cysteinmethylesters ein carboxymethyliertes Serin trägt, wurde der entsprechende *O*-Trityl-L-Serinmethylester **7** dargestellt. Dafür wurde L-Serinhydrochlorid in Methanol gelöst und mit Acetylchlorid umgesetzt. Unter sehr milden Bedingungen entsteht so HCl, das die Veresterung des L-Serins mit Methanol katalysiert. Der L-Serinmethylester **5** wurde in quantitativen Ausbeuten erhalten. Er wurde direkt mit Tritylchlorid und Triethylamin zum *N*-, *O*-Di-Trityl-L-serinmethylester **6** in einer Ausbeute von 53% umgesetzt. Die selektive Entschützung des Tritylaminens in Gegenwart des Tritylalkohols wurde durch sehr kurze Reaktionszeiten in eisgekühlter DCM/TFA (99:1) Reaktionslösung erreicht. Durch säulenchromatographische

Aufreinigung wurde O-Trityl-L-serinmethylester **7** in Ausbeuten von 40% erhalten (Abbildung 15).

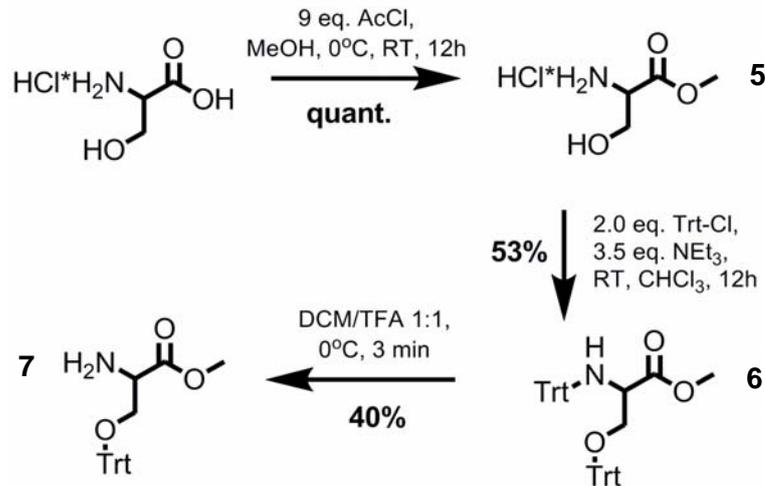


Abbildung 15: Synthese von O-Trityl-L-serinmethylester **7**, der für die Darstellung des nicht farnesylierten K-Ras4B Analogon eingesetzt wurde.

K-Ras4B kann, wie schon in der Einleitung beschrieben, an Serin 182 phosphoryliert werden. Phosphoryliertes K-Ras4B sollte in dieser Arbeit für biophysikalische Membranstudien eingesetzt werden. Weiterhin ist es für zellbiologische Experimente in weiterführenden Arbeiten von großer Bedeutung und daher ein interessantes Syntheseziel. Aufgrund der Säurelabilität des Farnesylrestes kann jedoch nicht auf die etablierten Phosphat-Schutzgruppen für die Fmoc-Festphasenchemie zurückgegriffen werden. Daneben ist die nachträgliche Phosphorylierung des C-Terminus von K-Ras4B nach der Peptidsynthese nicht mit der Schutzgruppenstrategie und den vorhandenen Cysteinen kompatibel.^[179] Aus diesem Grund wurde eine Schutzgruppe gewählt, die lichtinduziert abgespalten werden kann. Der entsprechende, von IMPERIALI et al. entwickelte Aminosäurebaustein N^α -Fmoc-phospho-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methyl-2-cyanoethyl-L-serin wurde in einer 6-stufigen Sequenz aus N^α -Fmoc-hydroxytrityl-L-serin hergestellt (Abbildung 15).^[180-181]

Dabei wurde N^α -Fmoc-hydroxytrityl-L-serin mit *tert*-Butyl-2,2,2-trichloracetimid umgesetzt und das in 78% Ausbeute erhaltene N^α -Fmoc-hydroxytrityl-L-serin-*tert*-butylester mit DCM/TFA/TES 97:1:2 zu N^α -Fmoc-L-serin-*tert*-butylester mit einer Ausbeute von 99% entschützt. Der freie Alkohol wurde mit dem zuvor aus 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorophosporamidit und (4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-methanol hergestellten 2-Cyanoethyl-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-diisopropylphosporamidit umgesetzt. Ohne Aufarbeitung wurde das Rohprodukt mit mCPBA zu N^α -Fmoc-phospho-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methyl-2-cyanoethyl-L-serin-*tert*-butylester oxidiert. Die

Ausbeute betrug über zwei Stufen hinweg 55%. Die Abspaltung des *tert*-Butylesters ergab schließlich mit einer Ausbeute von 60% den für die Fmoc-Festphasenpeptid-synthese einsetzbaren Aminosäurebaustein *N*^α-Fmoc-phospho-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl) methyl-2-cyanoethyl-L-serin (Abbildung 16). Diese Synthese wurde von Dr. DEBAPRATIM DAS durchgeführt.

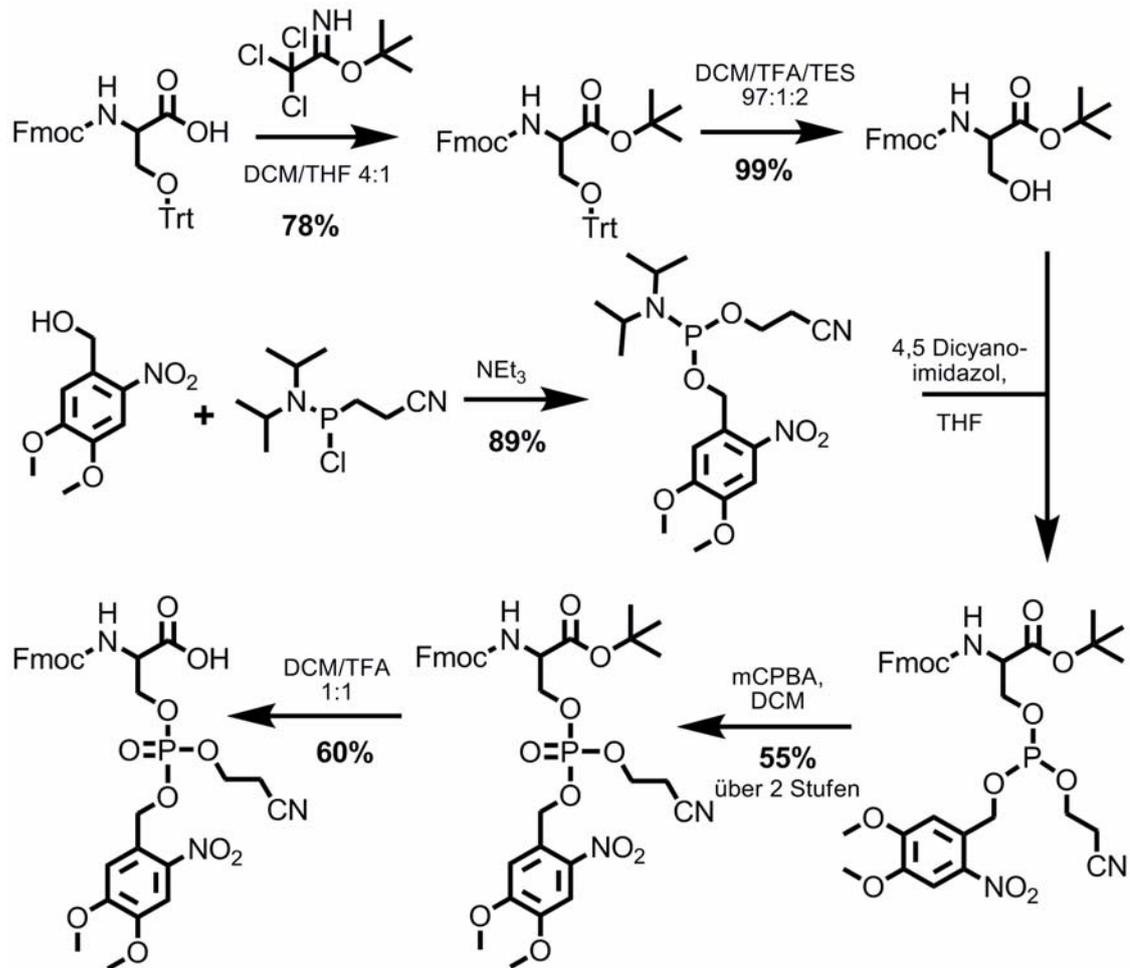


Abbildung 16: Synthese von *N*^α-Fmoc-phospho-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methyl-2-cyanoethyl-L-serin, das für die Darstellung von phosphoryliertem K-Ras4B verwendet wurde.

4.1.3 Festphasenpeptidsynthese von K-Ras4B Peptiden

Basierend auf einer schon durchgeführten Synthese^[111-112] für den carboxymethylierte C-Terminus von K-Ras4B wurde das zu synthetisierende Peptid über die Seitenkette eines Lysins an den polymeren Träger gebunden. Dafür wurde das orthogonal geschützte Fmoc-Lys(Boc)-OAlI 1 mit DCM/TFA (1:1) entschützt, über Nacht im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung für die Beladung des 2-29

Chlorotriylchlorid-Linkers verwendet. Das Rohprodukt wurde dafür in trockenem DCM und DIPEA gelöst und mit der zu beladenden festen Phase suspendiert. Nach ausgiebigem Waschen mit DCM und Trocknen des polymeren Trägers über Nacht im Hochvakuum wurde die Beladung mittels der Fmoc-Methode bestimmt. Diese lag für die verschiedenen Ansätze bei 0.4-0.5 mmol/g. Jeder Reaktionsschritt wurde mittels einer Abspaltung des Peptids vom polymeren Träger im analytischen Maßstab untersucht. Dafür wurde das Rohprodukt mittels LC-MS analysiert.

Die Synthese wurde zuerst in C-terminaler Richtung abgeschlossen, indem der Allylester des immobilisierten Fmoc-(Lys)-OAll mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ und Phenylsilan als Allylakzeptor unter Argonatmosphäre gespalten wurde. Die so entstandene, freie Carbonsäure wurde nach intensivem Waschen mit DCM/MeOH und Trocknen im Hochvakuum mit einer entsprechenden carboxymethylierten Aminosäure u.a. Cys(Far)-OMe **2** und PyBOP als Kupplungsreagenz umgesetzt. Die Verwendung anderer Kupplungsreagenzien wie z.B. DIC führte nicht zu einer quantitativen Kupplung. Nachdem die Synthese in C-terminaler Richtung abgeschlossen war, wurden für den vollständigen Aufbau des Peptides etablierte Protokolle der Festphasenpeptidsynthese herangezogen. Hierbei wurde einerseits HATU/HOAt und andererseits HCTU als Kupplungsreagenz eingesetzt und jede Aminosäure doppelt gekuppelt. Dabei wurde die Synthese sowohl manuell als auch durch einen Peptidsynthesizer mit und ohne Mikrowellenunterstützung durchgeführt. Nach der ersten Fmoc-Entschützung konnte auf der Stufe des Dipeptides Lys-Cys(Far)OMe nach analytischer Abspaltung und LC-MS Analyse keine Diketopiperazinbildung nachgewiesen werden.

Nach Abschluss der Peptidsynthese wurden die Alloc-/OAll-Schutzgruppen in einer Argonatmosphäre mit $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ unter basischen Bedingungen (Piperidin/DMF 4:1) entfernt. Nach intensivem Waschen und Trocknen des polymeren Trägers über Nacht wurden sowohl die Trityl-Schutzgruppen als auch das fertige Peptid mit DCM/TFA/TES (97:1:2) vom polymeren Träger abgespalten (Abbildung **17**). Danach wurde das Harz mehrmals mit DCM/MeOH, DCM und MeOH gewaschen. Um die Ausbeute zu optimieren wurde der polymere Träger nach Trocknen im Hochvakuum nochmals mit DCM/TFA/TES (95:3:2) inkubiert. Beide Abspaltungsfractionen wurden danach getrennt weiter verarbeitet und aufgereinigt, da ihre Qualität in Bezug auf die enthaltenen Nebenprodukte (z.B. Addition von Trifluoressigsäure an die Doppelbindung des Farnesylrestes) stark variierte. Bei der Verwendung von mehr als 3% TFA für die Abspaltung konnte das gewünschte Peptid mit intaktem Farnesylrest nicht mehr isoliert werden.

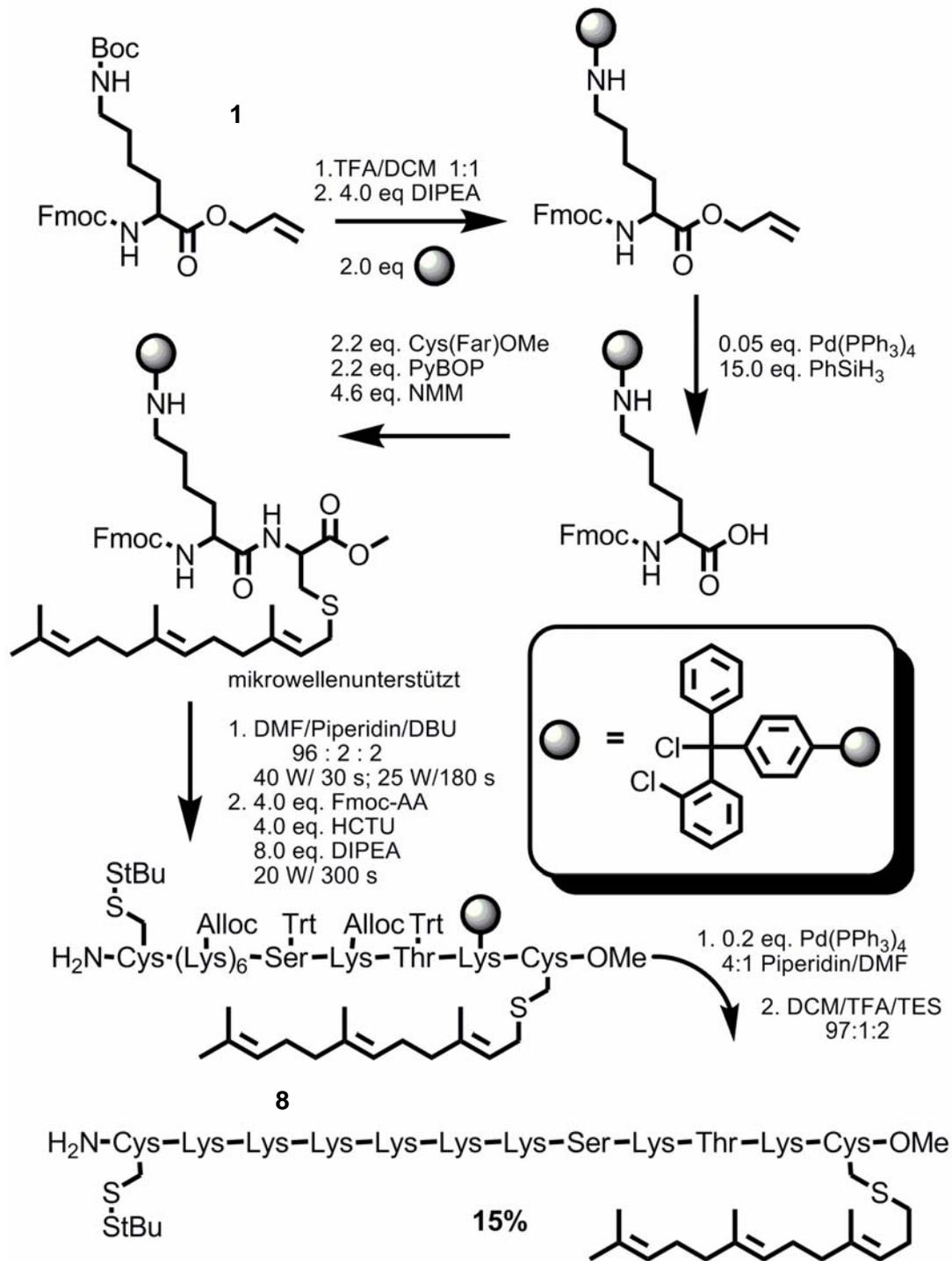


Abbildung 17: Schema für die generelle Synthese von polybasischen, carboxymethylierten und farnesylierten C-terminalen Peptiden am Beispiel des C-terminalen Dodecapeptids von K-Ras4B.

Die notwendige Aufarbeitung des Rohproduktes um diese polybasischen Peptide mittels LC-MS charakterisieren zu können, beinhaltet Diethyletherfällung und Gefriertrocknung. Die Diethyletherfällung wurde durchgeführt um nicht-peptidische

Bestandteile der Reaktionslösung, wie die Tritylschutzgruppen zu entfernen. Eine abschließende Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch eine „reversed phase“ HPLC. Das vollständig posttranslational modifizierte Dodecapeptid des K-Ras4B C-Terminus **8** konnte sowohl mit manueller Synthese, als auch unter Einsatz eines Peptidsynthesizers in Ausbeuten von 10% erhalten werden. Durch Verwendung eines mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizers steigerte sich die Ausbeute auf 15%. Die Qualität des Rohproduktes und die späteren Ausbeute von K-Ras4B Peptiden die mit HATU/HOAt oder HCTU synthetisiert wurden unterschieden sich nicht signifikant. So wurde für alle weiteren Synthesen das bedeutend preiswertere HCTU eingesetzt. Das Blockieren der noch nicht reagierten freien Aminogruppen des Peptids mit Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:9) nach jeder Doppelkupplung, um Deletionssequenzen zu minimieren, konnte die Qualität des Rohproduktes und die Ausbeute des Dodecapeptids nicht verbessern. Daher wurde davon abgesehen das sogenannte capping für die Synthese von K-Ras4B Peptiden zu verwenden.

Mit der vorgestellten Methodik war es möglich, diverse carboxymethylierte C-Termini von K-Ras4B in Ausbeuten von 9-17% zu synthetisieren (Abbildung **18**). Nach vorangegangener Ligation, konnten die in Abbildung **18** gezeigten Peptide für Membranbindungsstudien verwendet werden. Phosphoryliertes K-Ras4B **9** wurde von Dr. DEBAPRATIM DAS synthetisiert. Für die Synthese von K-Ras4B **10**, das anstatt eines phosphorylierten Serins eine Glutaminsäure als Phosphatanalogon besitzt, wurde Fmoc-Glu(OAll) verwendet. Der O-Allylester konnte auch mit Pd(PPh₃)₄ unter basischen Bedingungen (Piperidin/DMF 4:1) während der Alloc-Entschützung gespalten werden. Ein nicht farnesylierter C-Terminus **11**, der anstelle eines farnesylierten Cysteinmethylesters ein Serinmethylester trägt wurde durch die Verwendung des Aminosäurebausteins O-Trityl-L-serinmethylester **7** synthetisiert. Dafür wurde dieser Baustein während der Synthese des Peptids in C-terminale Richtung an die am polymeren Träger immobilisierte Carbonsäure von Fmoc-Lys gekuppelt.

Ein fluoreszentes K-Ras4B Analogon **12** wurde durch die Einführung eines zusätzlichen Lysins, dessen Seitenkette ein Dansyl trägt, erhalten.

Die Synthese von K-Ras Analoga ohne Carboxymethylierung wurde ebenfalls mit dem 2-Chlorotrityl-Linker durchgeführt. Dabei wurde die freie Säure der C-terminalen Aminosäure direkt mit dem Linker verknüpft.

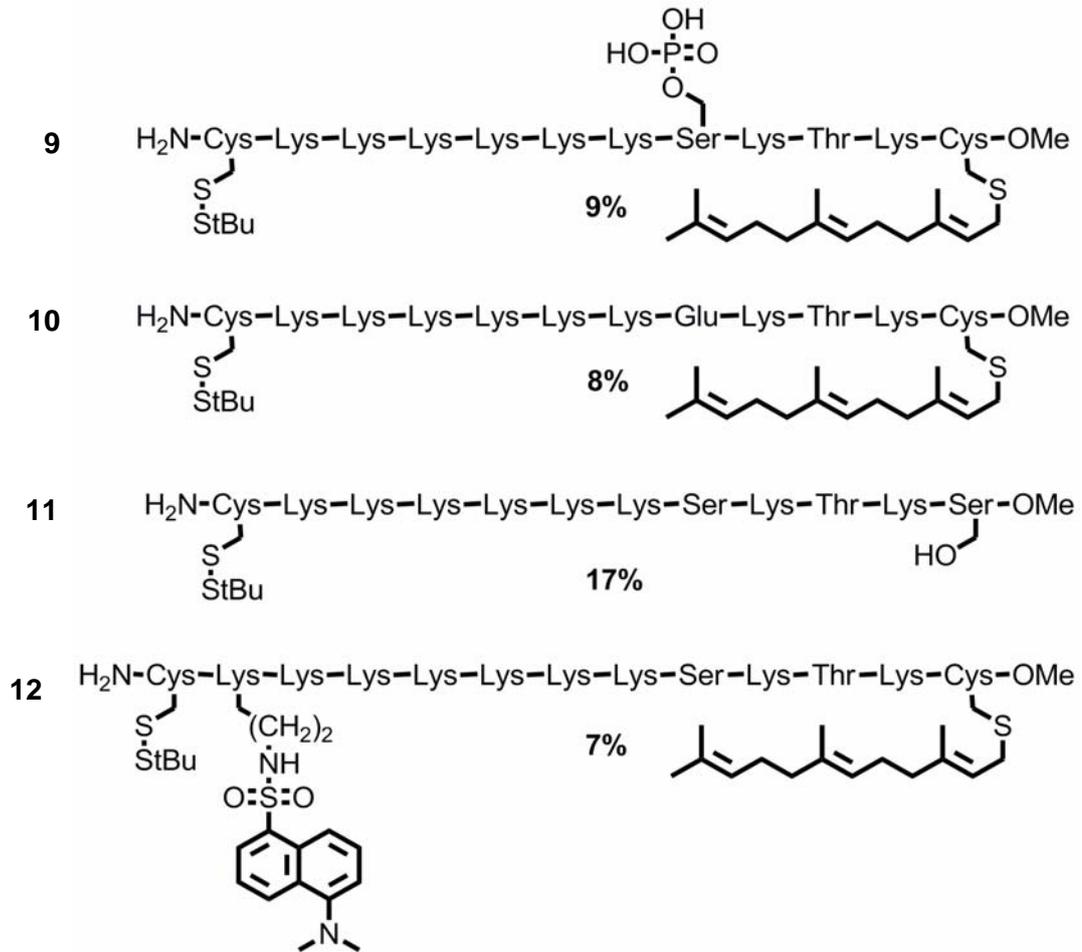


Abbildung 18: Schematische Darstellung der nach Kapitel 4.1.3 und Abbildung 17 synthetisierten unterschiedlichen Analoga des carboxymethylierten C-Terminus von K-Ras4B.

Bei der Beladung des 2-Chlorotrytil-Linkers mit Carbonsäuren muss besonders darauf geachtet werden, dass unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet wird. Die Beladung lag jeweils bei 0.7-0.8 mmol/g. Die Peptidsynthese wurde dann nach dem bereits beschriebenen Protokoll durchgeführt. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Einsatz der Mikrowelle für Carbonsäure-immobilisierte Peptide nicht von Vorteil ist. Beim Einsatz der Mikrowelle konnten nur Spuren des entsprechenden Peptides isoliert werden. Wurde die Synthese hingegen ohne Mikrowellenunterstützung durchgeführt, ergaben sich Ausbeuten zwischen 5% und 8% (Abbildung 19). Dies lässt sich wahrscheinlich auf die thermische Instabilität der Carbonsäureester-Verknüpfung zum polymeren Träger erklären.

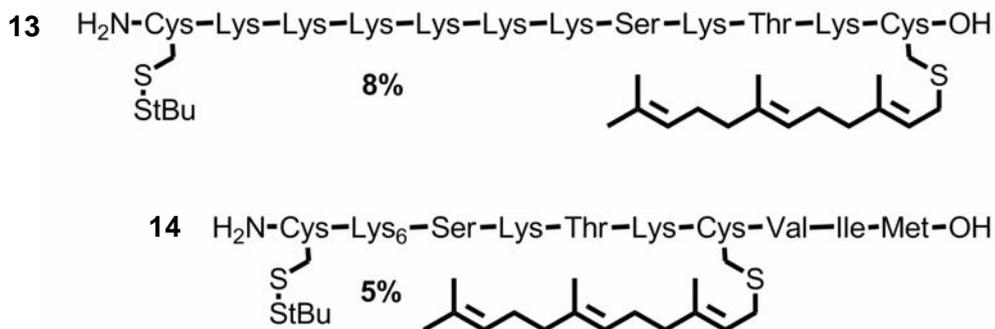
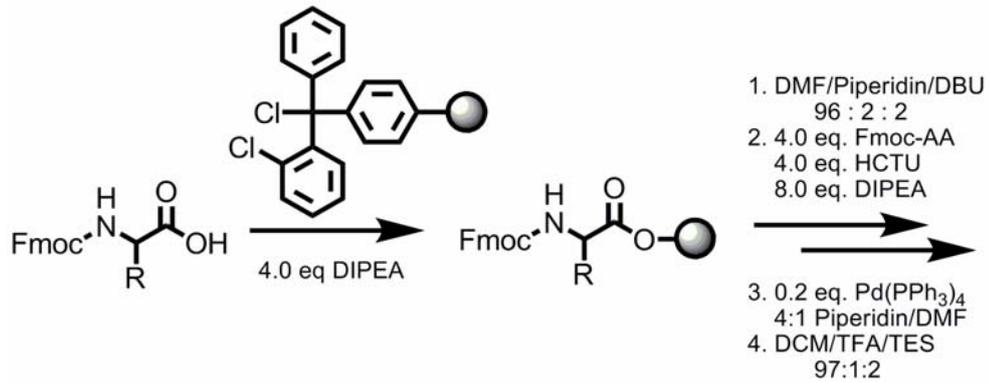


Abbildung 19: Schema für die Synthese von polybasischen und farnesylierten C-terminalen Peptiden mit freier Carbonsäure am C-Terminus und die entsprechend hergestellten Analoga des K-Ras4B C-Terminus.

Die für die Synthese kritischen Schritte sind die Pd(PPh₃)₄ katalysierten Entschützungen des Allylestere und der Alloc-geschützten Amine. Deshalb sind hier Inertgastechiken und sorgfältiges Entgasen von polymeren Träger und eingesetzten Lösungen unabdingbar. Das Pd(PPh₃)₄ sollte, wenn es eingesetzt wird, eine hell- bis neongelbe Farbe besitzen, denn als oranger Feststoff ist es für die beschriebenen Reaktionen nicht brauchbar. Es empfiehlt sich die Vollständigkeit dieser Reaktionen durch Abspaltungen im analytischen Maßstab zu überprüfen. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich dadurch, dass das vollgeschützte Dodecapeptid des K-Ras4B C-Terminus nur sehr schwer massenspektrometrisch (ESI und MALDI) nachgewiesen werden kann. Somit müssen auch die Alloc-Schutzgruppen für eine entsprechende Analytik abgespalten werden. Ein weiteres Problem stellt die Aufarbeitung mittels reversed phase HPLC dar. Die K-Ras4B Peptide zeigen aufgrund ihrer polybasischen Sequenz eine breite Verteilung auf der reversed phase Säule, sodass ein sehr breiter Peak detektiert wird, der zu einer erheblichen Anzahl an verunreinigten Fraktionen führt. Ein oft beobachtetes Nebenprodukt ist die Addition eines Trifluoressigsäure Moleküls [M+113] oder eines Wasser-Moleküls [M+18] an

den Farnesylrest, das bei zu hohen Trifluoressigsäure-Konzentrationen vorkommt. Diese Nebenprodukte können aber durch eine reversed phase HPLC abgetrennt werden.

4.1.4 Diskussion

Die verwendeten Synthesestrategien ermöglichen einen flexiblen Zugang zu lipidierten polybasischen Peptiden unabhängig von ihrer C-terminalen Funktionalisierung. Sie erlauben somit sowohl die C-terminale Einführung unterschiedlich modifizierte Aminosäuren als auch den Austausch von Aminosäuren in der polybasischen Sequenz und die Einführung z.B. negativer Ladung in den C-Terminus von K-Ras4B durch einen Phosphatrest.

Durch den Einsatz eines Peptidsynthesizers konnte erstmals die Synthese von lipidierten, polybasischen Peptiden automatisiert und somit eine immense Zeitersparnis erreicht werden. Die Syntheszeit von 6 Tagen bei manueller Synthese wurde auf 22 Stunden bei Einsatz eines Mikrowellensynthesizers reduziert und dabei die Qualität des Rohproduktes eindeutig verbessert und die Ausbeute gesteigert. Dies ist das erste Beispiel für die automatisierte Synthese von lipidierten Peptiden. Es ermöglicht eine schnelle und effiziente Synthese von unterschiedlichen Derivaten des C-Terminus von K-Ras4B, die für weitere Studien besonders mit semisynthetischen K-Ras4B-Proteinen notwendig ist.

4.1.5 Synthese des K-Ras4B Δ 1-174 Proteinthioesters

Der Proteinthioester konnte in seiner GDP-gebundenen Form durch die Verwendung des IMPACT® Systems von New England Biolabs erhalten werden. Die entsprechende DNA-Sequenz von K-Ras4B Δ 1-174 wurde dabei in den pTWIN2 Vektor kloniert. Das Fusionsprotein aus K-Ras4B Δ 1-174, einem Intein und einer chitinbindenden Domäne (CBD) wurde in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und durch eine Chitin-Affinitätschromatographie basierend auf der starken Wechselwirkung zwischen der Chitinsäule und der CBD aus dem Zelllysat isoliert. Der durch die Splicereaktion des modifizierten Inteins entstandene Thioester wurde mit 200 mM 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (MESNA) umgeestert und dadurch Ras4B Δ 1-174 von der Chitinsäule als Thioester abgespalten (Abbildung 20).

Es hat sich gezeigt, dass die Expressioneffizienz stark schwankte. Sie lag für den Thioester von K-Ras4B Δ 1-174 zwischen 3 und 15 mg pro 30 L Expressionskultur. Die

Ausbeute an Protein-Thioester ist auch stark von der Qualität der eingesetzten MESNA Lösung, die immer frisch hergestellt werden sollte, abhängig. Ferner hat die Verwendung neuer Chitinbeads einen positiven Einfluss auf die Effizienz der Isolierung.

Die Klonierungsarbeiten sowie die Expressionsstudien sind von E. PROBST und F. BULLER aus der Arbeitsgruppe von Dr. J. KUHLMANN durchgeführt worden.^[182-183] Die Herstellung von K-Ras4B Δ 1-174-MESNA wurde von C. NOVAK durchgeführt.

Expression des K-Ras4B Δ 1-174-Impact
Konstruktes in E.coli BL21

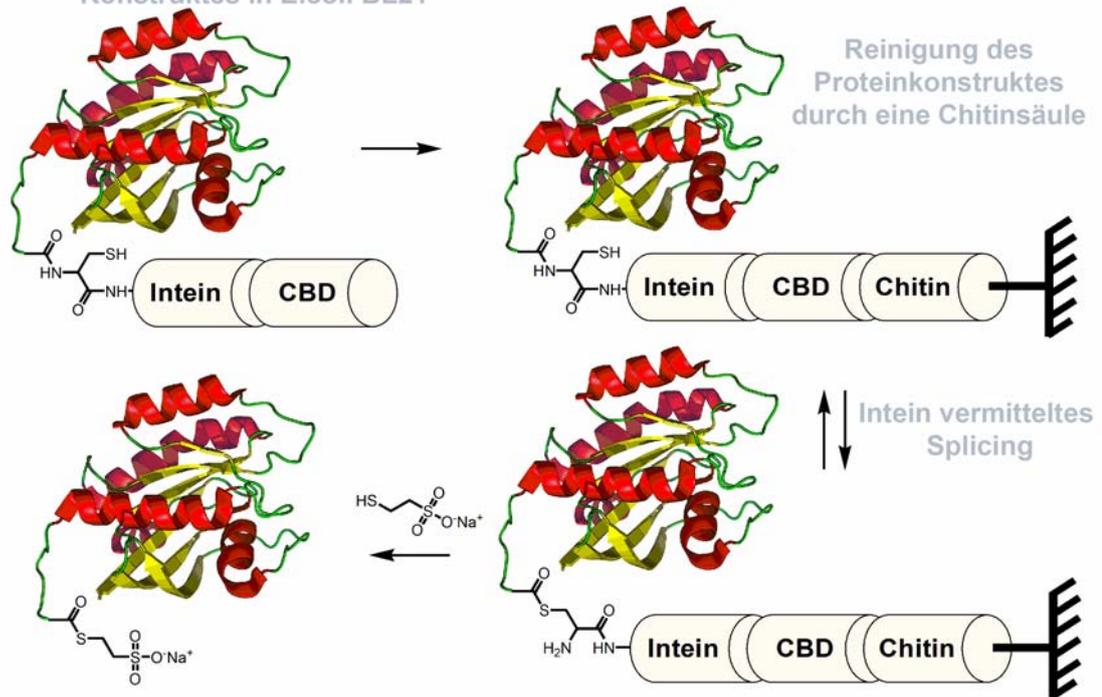


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Synthese des K-Ras4B Δ 1-174 Thioesters. Das K-Ras4B Δ 1-174-Intein-CBD-Konstrukt wird in E. coli BL21 (DE3) exprimiert. Nach der Lyse der Zellen wird das Lysat auf eine Chitinsäule gegeben, auf der das K-Ras4B Δ 1-174-Intein-CBD-Konstrukt zurückgehalten wird. Der durch die Splicereaktion entstandene interne Thioester wird durch MESNA abgefangen und so das Protein als aktivierter Thioester von der Säule gespült.

4.1.6 Ligation des K-Ras4B Δ 1-174 Proteinthioesters mit unterschiedlichen C-terminalen K-Ras4B Peptiden

Die abschließende Ligation des C-terminalen K-Ras Peptides mit dem entsprechend verkürzten K-Ras4B Δ 1-174 Thioester wurde in Tris-Puffer (pH 8.5) unter Argonatmosphäre durchgeführt, wobei 4 Äq. des K-Ras4B Peptides eingesetzt wurden. Dabei

wurde zuerst das Peptid in Tris-Puffer gelöst und die Cystein S_tBu Schutzgruppe reaktiv mit 5 mM TCEP abgespalten. TCEP wurde darüber hinaus benutzt, um reduzierende Bedingungen während der Ligationsreaktion aufrechtzuerhalten und unerwünschte Disulfidbildungen zu unterdrücken. Nach 5 min Inkubation wurde K-Ras4BΔ1-174-Mesna zur Reaktionslösung hinzugegeben und für weitere 3 h bei 4°C inkubiert.

Während der Reaktion kommt es zuerst zur intermolekularen Umesterung des K-Ras4BΔ1-174 Thioesters mit dem Thiol der Cysteinseitenkette des Peptides und anschließend unter Ausbildung einer Amidbindung zu einer intramolekularen S-, N-Acylwanderung.

Der Reaktionsansatz wurde nach Inkubation 1:1 verdünnt, um der besonders für Lipoproteinen typischen Proteinpräzipitation vorzubeugen. Das nicht gekoppelte Peptid wurde durch eine Dialyse abgetrennt. Danach wird das ligierte K-Ras4B **15** vom K-Ras4BΔ1-174 durch eine Kationenaustauschchromatographie abgetrennt. Aufgrund der polybasischen Sequenz des K-Ras C-Terminus unterscheidet sich das verkürzte K-Ras4BΔ1-174 (pI: 5.3) bedeutend vom Ligationsprodukt (pI: 8.2), sodass eine effiziente Reinigung durch Kationenaustauschchromatographie möglich war. Mit dieser Methodik wurde vollständig posttranslational modifiziertes K-Ras4B **15** in Ausbeuten von 75% erhalten (Abbildung 21).

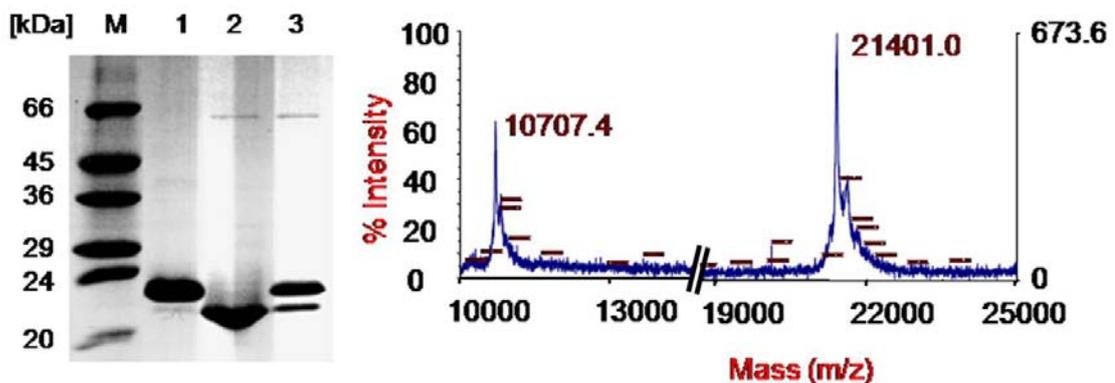


Abbildung 21: *Links:* SDS-Gel Analyse von [1] semisynthetischem K-Ras4B, [2] K-Ras4BΔ1-174-Mesna, [3] Ligationsansatz vor der Aufarbeitung, [M] Marker. *Rechts:* Massenspektrometrische Analyse des aufgearbeiteten semisynthetischen K-Ras4B mittels MALDI-TOF, $m/z_{ber.} = 21402.3$ $[M+H]^+$, $m/z_{gef.} = 21401.0$ $[M+H]^+$, 10707.4 $[M+2H]^{2+}$.

Für die Ligationsreaktion wurde auch nicht aufgereinigtes K-Ras4B Peptid **8** verwendet. Dieses wurde direkt nach der Diethyletherfällung für die Ligation ohne

weitere präparative HPLC Aufarbeitung eingesetzt. Nach Aufarbeitung des Kopplungsansatzes konnten 20% K-Ras4B Protein isoliert werden. Somit ist der Einsatz nicht aufgereinigter Peptide prinzipiell möglich, aber je besser ihre Qualität ist desto besser ist die Ausbeute an ligiertem Protein.

Basierend auf der beschriebenen Reaktionsführung und Aufarbeitungsstrategie konnten unterschiedliche C-terminale K-Ras4B Analoga (siehe Kapitel 4.1.3) mit dem Thioester von K-Ras4B Δ 1-174 umgesetzt werden und die entsprechenden Proteine erhalten werden (Abbildung **22**). Die Ligation der einzelnen Peptide mit dem Thioester von K-Ras4B Δ 1-174 verliefen mit Ausbeuten zwischen 10-75%. Sie verdeutlichen, dass die Expressed Protein Ligation eine sehr wertvolle Methode ist um polybasische lipidierte Proteine zu synthetisieren. Dabei ist die sehr gute Löslichkeit der K-Ras4B Peptide im Ligationspuffer von großem Vorteil. Im Vergleich zu der Synthese anderer lipidierter Proteine präzipitieren die einzelnen K-Ras4B-Proteine nur in sehr geringem Maße während der Ligation, was unter anderem die guten Ausbeuten erklärt.

Weiterhin ist durch die polybasische Sequenz der unterschiedlichen Peptide auch eine effiziente Reinigung des Ligungsansatzes durch Kationenaustauschchromatographie möglich. Dies erklärt warum phosphoryliertes K-Ras4B **17** nur in einer Ausbeute von 10% erhalten wurde. Die Kationenaustauschchromatographie, das zentrale Element der Aufreinigung, wurde durch die Einführung der negativen Ladung in die polybasische Sequenz stark beeinflusst und führte somit nur zu einer eingeschränkten Trennung zwischen phosphoryliertem K-Ras4B **17** und K-Ras4B Δ 1-174.

K-Ras4B und die Analoga wurden synthetisiert, um den Einfluss der Carboxymethylierung **19**, Farnesylierung **20**, der Phosphorylierung **17** und des Austausches des Phosphatrestes durch eine Carbonsäure **16** auf die Membranbindung zu untersuchen. K-Ras4B **18** besitzt noch die sogenannte CAAX-Box und stellt somit ein noch nicht vollständig prozessiertes K-Ras4B dar. Es ist farnesyliert und stellt ein Intermediat innerhalb der Zelle dar, dem noch die AAX-Sequenz abgespalten und der C-Terminus carboxymethyliert wird. K-Ras4B **21** ist durch eine Dansyl-Gruppe in der Seitenkette eines zusätzlichen Lysins der polybasischen Sequenz fluoreszenzmarkiert. Dies ermöglicht die Untersuchung von K-Ras4B mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden.

Alle Proteine wurden mittels SDS-Gel Analyse und massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF analysiert. Phosphoryliertes K-Ras4B **17** wurde von Dr. DEBAPRATIM DAS synthetisiert. Die weiteren Ligationen wurden in Zusammenarbeit mit C. NOVAK und E. PROBST^[183] aus der Arbeitsgruppe von Dr. J. KUHLMANN durchgeführt.

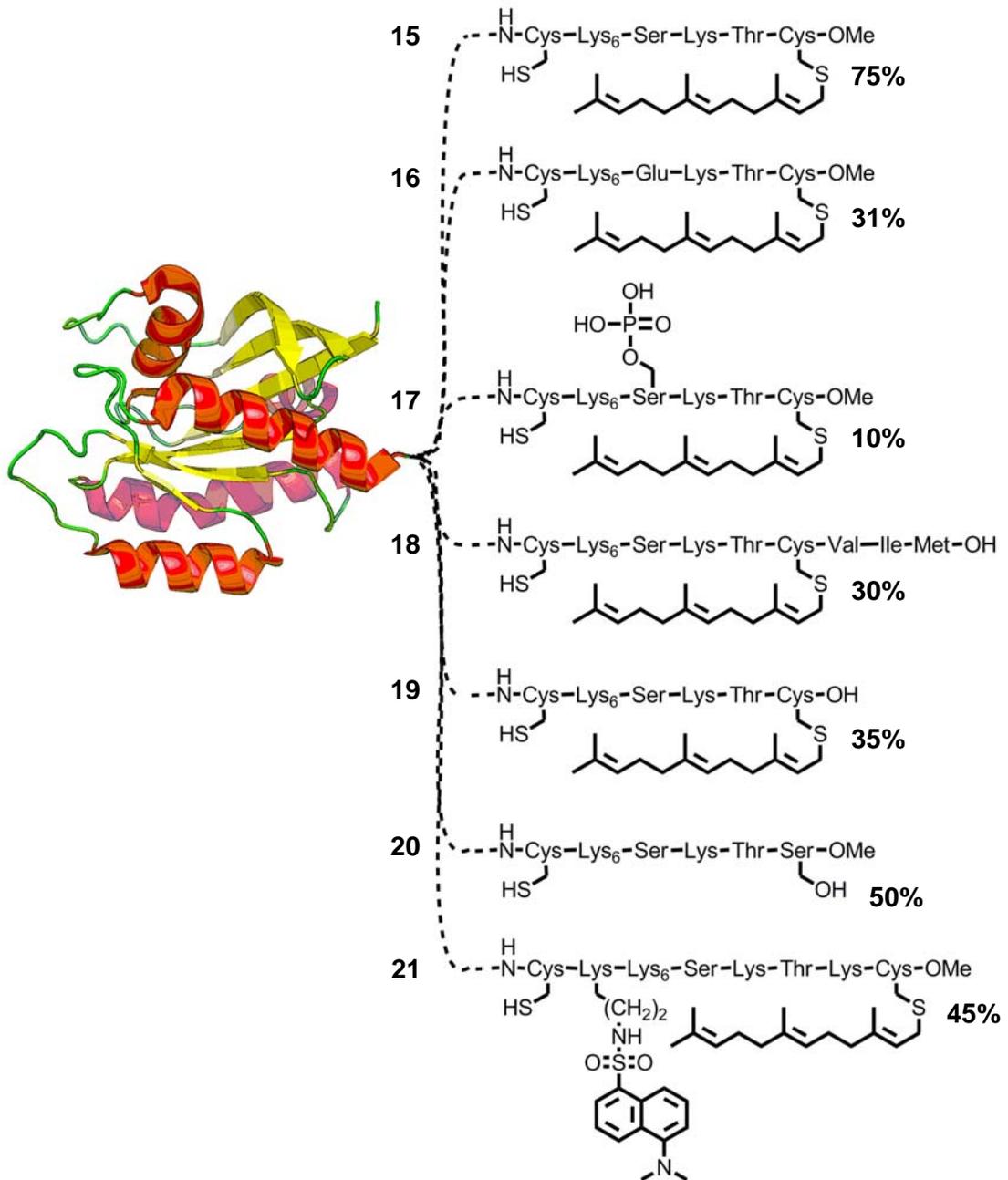


Abbildung 22: Schematische Darstellung der nach Kapitel 4.1.5 und Abbildung 18 und 19 synthetisierten unterschiedlichen Analoga des K-Ras4B Proteins.

4.1.7 Diskussion

In Verbindung mit einer Synthesestrategie für polybasische, farnesylierte Peptide wie den C-Terminus von K-Ras4B hat sich die Expressed Protein Ligation als verlässliche Methode zur Synthese unterschiedlicher K-Ras4B-Analoga herausgestellt. Für die Aufarbeitung des Ligationsproduktes ist nur die polybasische Sequenz der Peptide, die den pI des ligierten Proteins ausreichend ändert, notwendig. Im Vergleich zu den

schon für z.B. N-Ras Proteine durchgeführten MIC-Ligationen sind die erhaltenen Ausbeuten sehr gut. Dies lässt sich auf die schon erwähnte sehr gute Löslichkeit der K-Ras4B Peptide im Ligationspuffer zurückführen. Dies zeigt den Vorteil der gewählten Schnittstelle für die Expressed Protein Ligation. Die Schnittstelle liegt N-terminal der polybasischen Sequenz, die schwer zu synthetisieren ist. Aber durch ihre Inkorporation in das zu ligierende Peptid wird dieses wasserlöslich.

Die meisten lipidierten Peptide müssen durch die Zugabe von Detergentien in wässrigen Medien gelöst werden. Diese Detergentien nach der Ligation wieder zu entfernen ist meistens schwierig und führt zur teilweisen Präzipitation des Proteins.

Auch der Vergleich mit Synthesen von Lipoproteinen, die durch Expressed Protein Ligation hergestellt wurden, zeigt die Vorteile der polybasischen Sequenz. Für z.B. die Synthese von geranylgeranylierten Rab-Proteinen wird ein zusätzliches Protein REP (rab escort protein) benötigt, das die korrekte Faltung der bei der Ligation denaturierten Rab-Proteine unterstützt.^[184]

4.1.8 Biologische Evaluierung von semisynthetischem K-Ras4B

In einem phänotypischen Assay wurde die biologische Aktivität des semisynthetischen K-Ras4B untersucht. Durch diese Untersuchungen sollte geklärt werden, ob das im C-Terminus eingeführte Cystein, das für die Ligation notwendig war, die biologische Aktivität von K-Ras4B beeinflusst. Weiterhin sollte untersucht werden, ob das K-Ras4B-Protein nach mehreren Reinigungsschritten und Modifizierungen noch seine native dreidimensionale Struktur besitzt und nicht denaturiert ist, oder ob seine Interaktionen mit Membranen und Effektoren *in vivo* gestört sind und seine GTPase-Funktion im zellulären Kontext beeinträchtigt ist. Um diese Fragestellungen zu beantworten wurde von E. PROBST aus der Arbeitsgruppe von Dr. J. KUHLMANN ein PC12-Zellassay durchgeführt.^[183]

Die PC12 Zellen stammen aus dem Phäochromocytom der Ratte. Diese entarteten chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks sind, ontogenetisch betrachtet, modifizierte Nervenzellen.^[185-186] Durch Stimulierung mit NGF bilden die PC12-Zellen reversibel neuritenartige Ausläufer aus. Diese morphologische Veränderung kann u.a. durch onkogenes Ras, wie z.B. die Mutante G12V, induziert werden (Abbildung **23**). Die Mutation behindert die GTP-Hydrolyse, sodass die Ras-Signalkaskade - ohne Stimulation durch NGF - permanent aktiviert ist.^[187] Biologisch aktiv sind nur solche Ras-Proteine, die entweder *in vitro* bereits vollständig prozessiert worden sind oder *in vivo* noch vollständig prozessiert werden können.

Das onkogene, semisynthetische K-Ras4B ließ sich mittels Mikroinjektion in die Zellen einbringen. Um die Differenzierung zu quantifizieren, wurde ein Fluoreszenzfarbstoff coinjiziert. Onkogenes, semisynthetisches K-Ras4B G12V zeigte bei einer Proteinkonzentration von 200 μ M eine Differenzierungseffizienz von 67% \pm 5%. Die Differenzierungseffizienz der Positivkontrolle N-Ras G12V liegt bei 69% \pm 9%, vergleichbar. Dieses onkogene N-Ras-Protein wird nach der Mikroinjektion zur Ausführung seiner biologischen Funktion von der zellulären Maschinerie posttranslational modifiziert. Als Negativkontrolle wurde ein verkürztes onkogenes N-Ras Δ 1-181 G12V mikroinjiziert, das aufgrund des fehlenden C-Terminus keine Transformation der PC12-Zellen induziert.

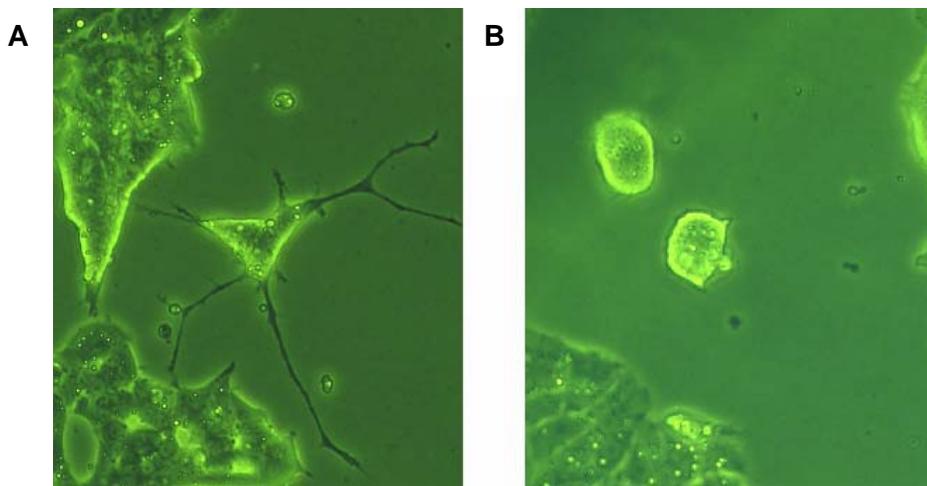


Abbildung 23: *PC12 Zellassay um die biologische Aktivität von semisynthetischem K-Ras4B zu bestimmen. Onkogenes, biologisch aktives K-Ras4B **22** induziert nach Mikroinjektion neuritenartige Ausläufer in PC12-Zellen. **A:** Mikroinjektion von biologisch aktivem, semisynthetischem K-Ras4B G12V führt zu neuritenartigen Ausläufern in PC12-Zellen. **B:** Mikroinjektion einer Negativkontrolle, N-Ras Δ 1-181 G12V, die nicht posttranslational modifiziert werden kann und deshalb nicht biologisch aktiv ist.*

Der PC12-Zellassay beweist augenscheinlich, dass sowohl die Einführung des zusätzlichen Cysteins am C-Terminus, als auch die Ligation und Aufarbeitung von K-Ras4B zu biologisch aktiven Konstrukten führt. Die entwickelte Methode ist folglich für die Synthese unterschiedlichster biologisch aktiver K-Ras4B-Analoga geeignet.

4.2 Synthese von H-Ras Proteinen durch Expressed Protein Ligation

Nach der erfolgreichen Synthese von biologisch aktivem, semisynthetischem K-Ras4B **15** sollte diese Synthesestrategie auf H-Ras-Proteine übertragen werden. Der C-Terminus von H-Ras besteht ebenfalls aus einem carboxymethylierten, farnesylierten Cystein und zwei weiteren Cysteinen, die im zellulären Kontext reversibel palmitoyliert werden.

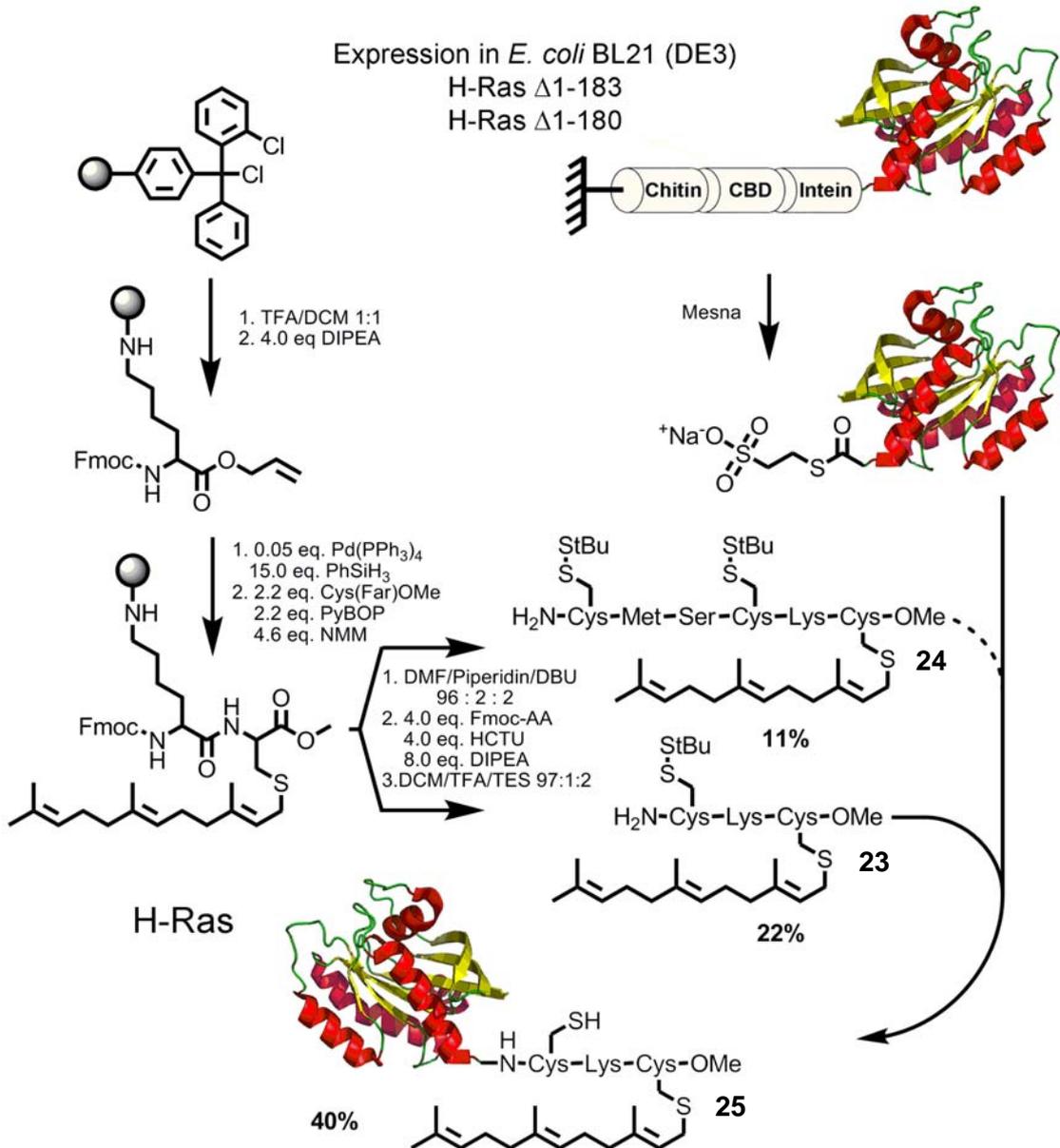


Abbildung 24: Synthese von carboxymethylierten und farnesylierten C-terminalen H-Ras Peptiden und Proteinen am Beispiel der Expressed Protein Ligation des H-Ras Δ 1-180-Mesna und H-Ras Δ 1-183-Mesna mit den entsprechenden H-Ras Tri- **23** und Hexapeptiden **24**.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte farnesyliertes, carboxymethyliertes H-Ras mittels Expressed Protein Ligation synthetisiert werden.

Die Cysteine an Position 181 und 184 sind zwei mögliche retrosynthetische Ligationspunkte für die Synthese des H-Ras-Proteins.

Es wurde daher sowohl das verkürzte Protein H-Ras Δ 1-180-Mesna, als auch H-Ras Δ 1-183-Mesna exprimiert. Dafür wurde die schon in den vorangegangenen Kapiteln benutzte Intein-Technologie verwendet. Diese Klonierungs- und Expressionsarbeiten wurden von E. PROBST durchgeführt.

Die Synthese der entsprechenden C-terminalen H-Ras Tri- **23** und Hexapeptide **24** wurde ebenfalls mit der für K-Ras erprobten Synthesestrategie durchgeführt. Sie ergab Ausbeuten von 22% für das Tripeptid **23** und 11% für das Hexapeptid **24**.

Bei der Durchführung der Ligationsreaktion des Thioesters von H-Ras Δ 1-183 und dem entsprechenden Tripeptid unter den für K-Ras4B erprobten Bedingungen (Tris-Puffer pH 8.5, 5 mM TCEP, Argonatmosphäre, 4 Äq. Peptid **23**) konnte kein Umsatz beobachtet werden. Die massenspektrometrische Analyse des Reaktionsgemisches zeigte, dass die reduktive Abspaltung der S-*t*Bu Schutzgruppe unter den gewählten Bedingungen nicht stattfand und folglich ein freies Thiol für die Durchführung der Ligationsreaktion nicht zur Verfügung stand. Die Thiolschutzgruppe konnte schließlich in Carbonatpuffer pH 9 mit 5 mM TCEP entschützt werden. Das entschützte Peptid wurde daraufhin mit Trispuffer pH 8.5 umgepuffert und mit dem Mesna-aktivierten H-Ras Δ 1-183 umgesetzt. Für die Aufarbeitung des ligierten Proteins konnte keine Kationenaustauschchromatographie verwendet werden, da sich ein verkürztes und ein ligiertes H-Ras-Protein in ihrem *pI* nicht hinreichend unterscheiden. Da sich aber die Lipophilie des H-Ras-Proteins durch die Kupplung mit einem lipidierten Peptid stark verändert, konnte die Tritonextraktion als effiziente Aufarbeitungsstrategie verwendet werden. Bei diesem Vorgang reichert sich das lipidierte Protein in der Triton-Phase an, während H-Ras Δ 1-183 in der wässrigen Phase bleibt. Die Tritonextraktion wurde bereits erfolgreich für die Aufarbeitung semisynthetischer N-Ras-Proteine verwendet.^[172] Nach Aufarbeitung erhielt man das farnesylierte, carboxymethylierte H-Ras-Protein in 40% Ausbeute bei einem Einsatz von 9 Äq. Tripeptid **23** (Abbildung **24**).

Die Ligation von H-Ras Δ 1-180-Mesna und entsprechendem Hexapeptid **24** war nicht erfolgreich. Da aber die Ligation von H-Ras Δ 1-183-Mesna und dem entsprechenden Tripeptid **23** erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde ein effizienter Zugang zu carboxymethylierten, farnesylierten H-Ras-Proteinen geschaffen. Daher hatte die Entwicklung einer weiteren Ligationsposition, die sich nur um 3 Aminosäuren

unterscheidet, eine geringere Priorität. Die Ligationsreaktionen sowie die Klonierungs- und Expressionsarbeiten wurden von E. PROBST aus der Arbeitsgruppe von Dr. J. KUHLMANN durchgeführt.^[183]

4.3 Biophysikalische Charakterisierung eines potentiellen isoprenylsensitiven K-Ras4B Interaktors

Die Entwicklung einer effizienten Synthesestrategie für farnesylierte, carboxymethylierte K-Ras4B und H-Ras-Proteine ermöglichte die biophysikalische in vitro-Untersuchung dieser Proteine. Dabei ist eine immer noch größtenteils ungeklärte Frage, ob es ein Shuttle-Protein gibt, das den Transport der unterschiedlichen Ras Isoformen zwischen den einzelnen Membrankompartimenten organisiert. Es ist denkbar, dass ein solches Protein den farnesylierten C-Terminus erkennt, ihn bindet und so vor hydrophoben, unspezifischen Wechselwirkungen innerhalb des Cytoplasmas schützt. Dieses Shuttle-Protein würde als solubilisierender Faktor für lipidierte Proteine fungieren und sie davor bewahren im Cytoplasma zu aggregieren.

4.3.1 Die δ -Untereinheit der Phosphodiesterase 6

In der Literatur wird immer wieder die δ -Untereinheit der Phosphodiesterase 6 (PDE δ) als mögliches Shuttle-Proteine genannt. Diese Untereinheit solubilisiert und reguliert den sonst membranständigen Phosphodiesterase 6 Komplex, indem sie zwei Untereinheiten dieses Komplexes, die für diese Interaktion isoprenyliert und carboxymethyliert sein müssen, bindet.^[188-189] Da PDE δ im Gegensatz zur Phosphodiesterase 6 ubiquitär exprimiert ist, wird eine übergeordnete regulatorische biologische Funktion vermutet.^[190]

In Yeast-two-Hybrid Assays konnte gezeigt werden, dass PDE δ mit prenylierten Ras- und Rap-GTPasen^[173] sowie Rab13^[190], RheB^[191], Rho6^[191], G α_{i1} ^[191] und der Rhodopsin Kinase (GRK1)^[192] interagiert. *In vivo*-Überexpressionsexperimente bestätigen die Fähigkeit von PDE δ , die membranständigen Proteine Ras und Rap unabhängig vom gebundenen Nukleotid (GTP oder GDP) zu solubilisieren, indem es den cytosolischen Anteil dieser Proteine erhöht.^[173] In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die korrekte posttranslationale Modifizierung der Proteine - Isoprenylierung und Carboxymethylierung - Voraussetzung für die Interaktion mit PDE δ ist.^[191] Affinitätsmessungen mit isoprenylierten, carboxymethylierten Cysteinen

zeigen dass PDE δ farnesylierte Strukturen bedeutend besser bindet als geranylgeranylierte Strukturen.^[192]

Strukturell ähnelt PDE δ dem Protein RhoGDI (Rho GDP-Dissociation Inhibitor) und besitzt eine hydrophobe Tasche, die in beiden Proteinen homolog ist. Dies lässt vermuten, dass nicht nur die 3-dimensionale Struktur, sondern auch die biologische Funktion in Bezug auf diese Lipidbindetasche sehr ähnlich ist.^[191] RhoGDI extrahiert durch Komplexbildung prenylierte, mit GDP beladene Rho GTPasen aus Membranen ins Cytosol und inhibiert den Austausch von gebundenem GDP zu GTP.

Zusammenfassend wird PDE δ in der Literatur als prenylbindendes Protein beschrieben, das über eine hydrophobe Tasche verfügt, die aus dem strukturell sehr ähnlichen RhoGDI bekannt ist. PDE δ kann insbesondere farnesylierte, carboxymethylierte Proteine binden, ins Cytosol extrahieren und ist an ihrem Transport zwischen unterschiedlichen Membrankompartimenten beteiligt. Im Gegensatz zu RhoGDI ist die Funktion von PDE δ nicht vom Nukleotid Beladungszustand abhängig. Außerdem zeigt PDE δ Affinität zu einer Reihe unterschiedlichster Proteine einschließlich Proteinkinasen, PDE-Untereinheiten und GTPasen.

Da es bis jetzt noch nicht möglich war, die entsprechenden Proteine posttranslational modifiziert *in vitro* darzustellen, konnte bisher keine der PDE δ -Interaktionspartner-Wechselwirkungen mit klassischen biophysikalischen Methoden *in vitro* charakterisiert werden und die strukturellen Erfordernisse für die Bildung eines solchen Komplexes eindeutig geklärt werden.

4.3.2 Oberflächenplasmonenresonanz-Experimente

In einem Oberflächenplasmonenresonanz-Experiment (SPR) (genaue Beschreibung der Methode siehe Kapitel 4.4.1) sollte die Fähigkeit von PDE δ untersucht werden, die semisynthetischen Isoformen H-Ras und K-Ras4B aus künstlichen Membranen zu solubilisieren. Dabei wurden die beiden Proteine an einer negativ geladenen artifiziellen Membran adsorbiert und ihr Dissoziationsverhalten bei unterschiedlichen PDE δ -Konzentrationen untersucht (Abbildung 25).

Für den Aufbau künstlicher Membranen im BiacoreTM-System eignen sich L1-Sensorchips. Diese tragen eine lipophil modifizierte, carboxymethylierte Dextranschicht, auf der kleine, unilamellare Lipidvesikel spontan an der Oberfläche adsorbieren und ihre hydrophoben Seitenketten inkorporieren.^[193] In unabhängigen Experimenten werden Proteinlösungen beider lipidierter Proteine über artifizielle, negativ geladene Membranen (K-Ras4B 60% POPC/ 40% POPS; H-Ras 80% POPC/ 20% POPS; POPC: 1-

Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin; POPS: 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin) gespült. Die Membranzusammensetzungen wurden so gewählt, dass eine ausreichende Proteinadsorption gewährleistet ist. Nach der Adsorption wurden die jeweils mit lipidisiertem Protein beladenen artifiziellen Membranen mit Puffer sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen von PDE δ gespült und die Dissoziation über die Abnahme des SPR-Signals verfolgt.

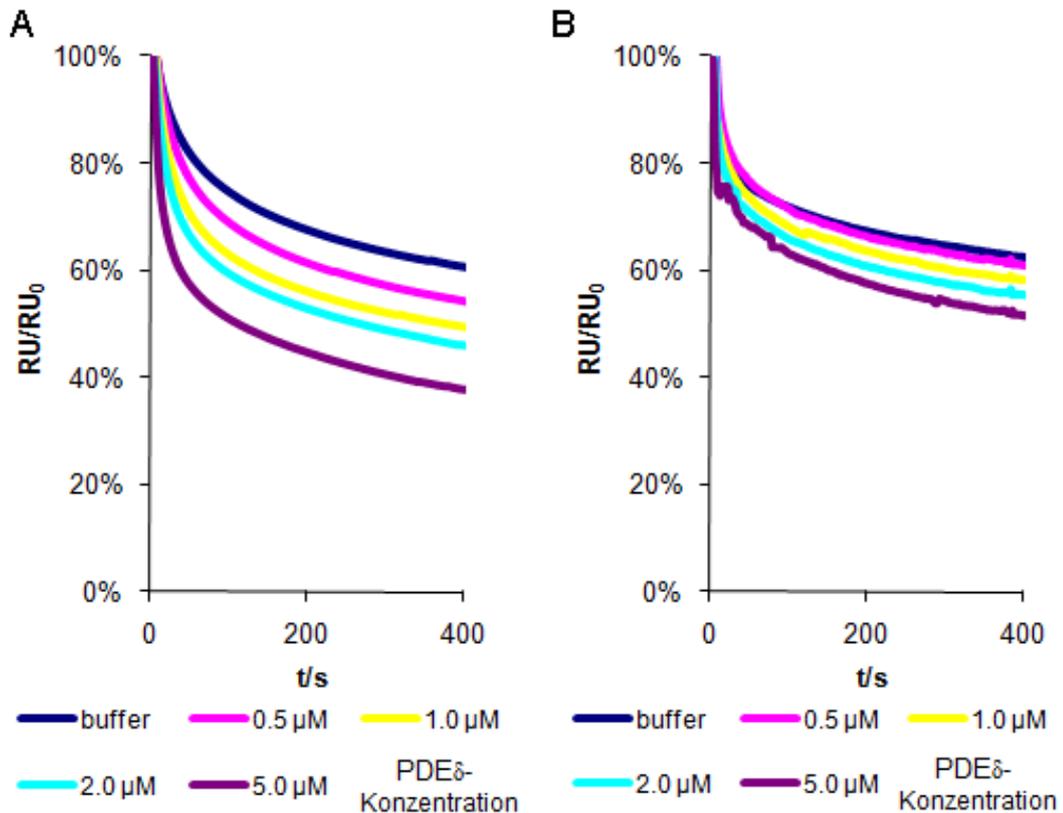


Abbildung 25 : Oberflächenplasmonenresonanz-Experiment mit semisynthetischem K-Ras4B **15**, farnesyliertem H-Ras **25** und PDE δ . **A**; Die Dissoziation von semisynthetischen K-Ras4B **15**, **B**: farnesyliertem H-Ras **25** von artifiziellen Membranen in Abhängigkeit unterschiedlicher PDE δ Konzentrationen wird durch das normalisierte SPR-Signal (RU/RU_0) beobachtet. Die Dissoziation von semisynthetischem K-Ras zeigt eine stärkere Abhängigkeit von der PDE δ Konzentration als farnesyliertes H-Ras.

Es zeigt sich, dass die Dissoziation beider Proteine abhängig von der eingesetzten PDE δ -Konzentration ist. Für semisynthetisches K-Ras4B **15** ergibt sich eine deutlich stärkere Abhängigkeit der Dissoziation von der eingesetzten PDE δ -Konzentration als für farnesyliertes H-Ras **25**. Bei einer PDE δ -Konzentration von 5 μ M in der Dissoziationsphase wurden mehr als 60% des adsorbierten K-Ras4B **15** aus der

Membran desorbiert, während unter denselben Bedingungen nur 45% von H-Ras **25** solubilisiert werden konnten. Die beiden oben beschriebenen Experimente wurden von und E. PROBST^[183] durchgeführt.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass PDE δ mit unterschiedlichen farnesylierten Proteinen interagieren kann, diese Wechselwirkung aber anscheinend unterschiedlich stark ausgebildet ist. Besonders auffällig ist, dass die beiden Isoformen H-Ras und K-Ras4B, die eine hohe Sequenzidentität besitzen und sich maßgeblich einzig in ihrer C-terminalen Sequenz unterscheiden, unterschiedliche Affinitäten zu PDE δ aufweisen. Daher wurde die Wechselwirkung zwischen PDE δ und K-Ras4B genauer charakterisiert.

Zuerst sollte die Interaktion beider Proteine mittels SPR-Experimenten analysiert werden. Deshalb wurde ein entsprechender Sensorchip mit Anti-GST Antikörper kovalent modifiziert und ein GST-PDE δ Fusionsprotein über diese spezifische Wechselwirkung auf der Oberfläche immobilisiert. Dieser Chip wurde dann mit unterschiedlichen Konzentrationen von K-Ras4B gespült, währenddessen wurden die Assoziation sowie die Dissoziation beobachtet. Diese Versuche zeigten, dass semisynthetisches K-Ras4B **15** sehr unspezifisch an den Anti-GST Antikörper bindet, was eine verlässliche Auswertung der Daten unmöglich macht.

4.3.3 Fluoreszenzpolarisationsexperimente

Alternativ zur SPR wurde die Interaktion von K-Ras4B und PDE δ mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden analysiert. Hierfür wurden unterschiedliche dansyl-modifizierte C-terminale K-Ras4B-, H-Ras- und N-Ras-Peptide, ein durch Nukleotid-austausch mit Mant-GppNHp fluoreszierendes, semisynthetisches K-Ras4B sowie Rheb synthetisiert und zusätzlich ein bodipy-modifiziertes farnesyliertes N-Ras-Protein eingesetzt. Ihre Affinität zu PDE δ wurde in einem Fluoreszenzpolarisationsassay bestimmt. Das Rheb-Protein wurde von Dr. Y. CHEN und das N-Ras-Protein von Dr. G. TRIOLA zur Verfügung gestellt. PDE δ und PDE δ -GST wurden von Dr. K. UHLENBROCK und Dr. L. GREMER zur Verfügung gestellt.

4.3.3.1 Synthese der fluoreszenzmarkierten Peptide und Proteine

Da lipidierte Peptide oftmals schwer löslich sind, sollte ein hydrophiler dansyl-modifizierter Polyethylenglycol-Linker **29** synthetisiert werden, der die Löslichkeit der Peptide erhöht.

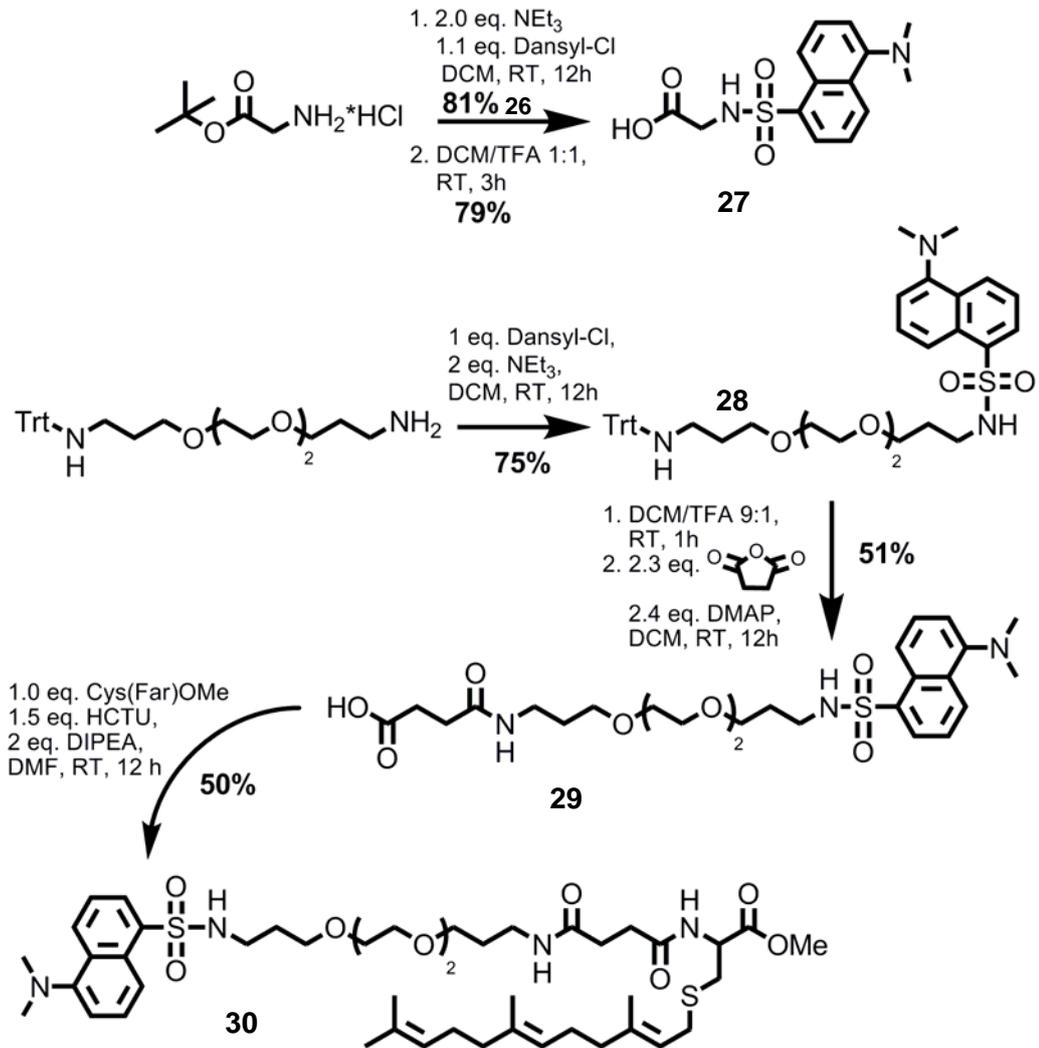


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Synthese von Dansyl-N-glycin **26** und des hydrophilen Linkers Dansyl-NH-(PEG)₂-NH-C₂H₄-COOH **29** und seiner weiteren Umsetzung zu Dansyl-(PEG)₂-Cys(Far)OMe **30**.

Die Synthese des Polyethylenglycol-Linkers ging von monogeschütztem H₂N-(PEG)₂-NH-Trt aus, das mit Dansylchlorid zu Dansyl-NH-(PEG)₂-NH-Trityl **28** reagierte. Die Trityl-Schutzgruppe wurde unter sauren Bedingungen (DCM/TFA 9:1) entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Toluol coevaporiert und direkt mit Bernsteinsäureanhydrid und DMAP zu Dansyl-NH-(PEG)₂-NH-C₂H₄-COOH **29** umgesetzt. Der dansylmodifizierte Polyethylenglycol-Linker wurde sowohl in der Peptidsynthese eingesetzt als auch direkt in Lösung mit Cys(Far)-OMe **2** zu Dansyl-(PEG)₂-Cys(Far)-OMe **30** umgesetzt. Für das polybasische C-terminale Undecapeptid von K-Ras4B **9** wurde aufgrund der schon vorhandenen sehr guten Wasserlöslichkeit ein Dansyl-N-glycin **27** zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzt. In zwei Stufen konnte dieser Aminosäurebaustein ausgehend von Glycin-*tert*-butyl-ester Hydrochlorid mit

Dansylchlorid umgesetzt werden, um nach Entschützung der Carbonsäure Dansyl-N-glycin **27** zu erhalten (Abbildung 26).

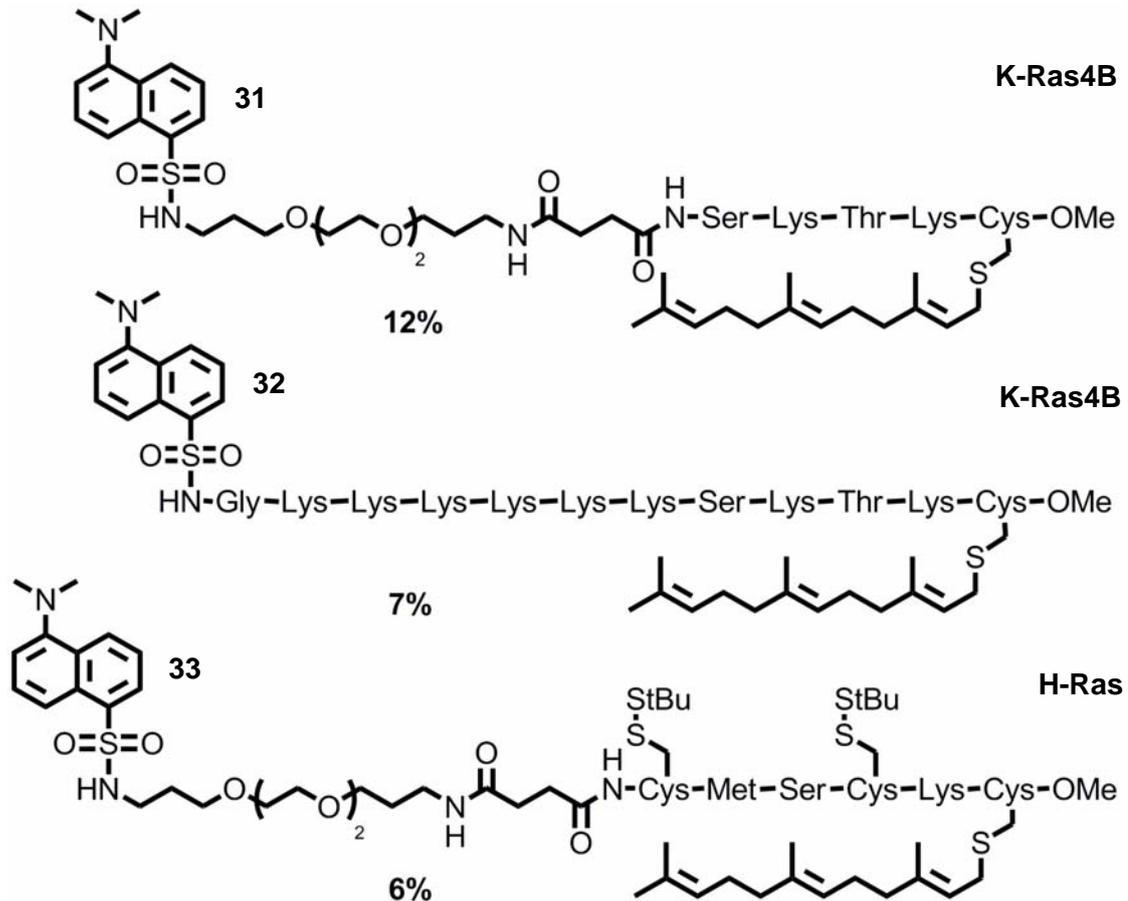


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Struktur, der für die Polarisationsmessungen eingesetzten C-Terminalen Peptide von H-Ras und K-Ras4B. und der Synthese des C-terminalen N-Ras Peptides. Die H-Ras und K-Ras4B Peptide wurden nach der in Kapitel 4.1.3 vorgestellten Methodik synthetisiert.

Sowohl die C-terminalen dansylmodifizierten Penta- **31** und Undecapeptide **32** von K-Ras4B, als auch das entsprechende H-Ras Hexapeptid **33** wurden nach der in Kapitel 4.1.3 vorgestellten Strategie synthetisiert und nach der Umsetzung mit dem entsprechenden dansylmodifizierten Baustein an der festen Phase in Ausbeuten von 6-12% erhalten (Abbildung 27). Das Heptapeptid des N-Ras C-Terminus **34** wurde unter Verwendung einer etablierten Methode mit dem Hydrazidanker synthetisiert.^[194] Das Peptid konnte nach Cu(II)-vermittelter Oxidation des Linkers mit Methanol als Methylester vom polymeren Träger abgespalten werden (Abbildung 28). Dansyl-Cys(Far)-OMe **35** wurde durch Reaktion von Cys(Far)-OMe **2** mit Dansylchlorid er-

halten. Das geranylgeranyierte Analogon **38** wurde in einer 3-stufigen Reaktionssequenz synthetisiert (Abbildung 29).

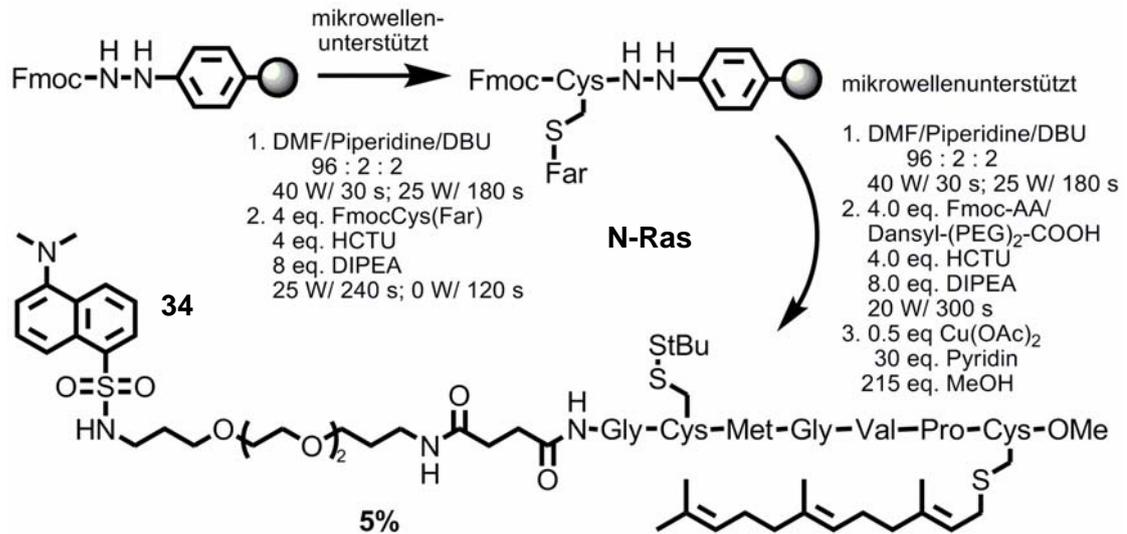


Abbildung 28: Synthese und Struktur des für die Polarisationsmessungen eingesetzten C-terminalen N-Ras Peptids.

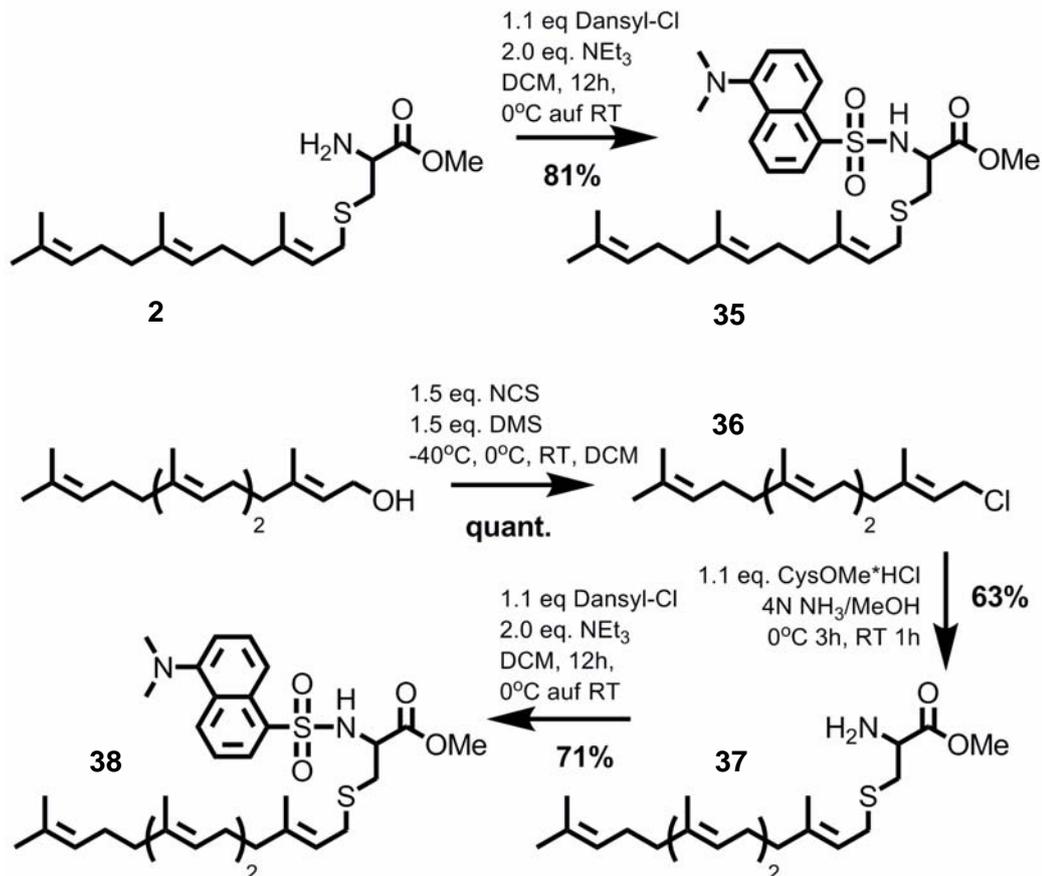


Abbildung 29: Struktur und Synthese der für die Polarisationsmessungen eingesetzten isoprenylierten carboxymethylierten Cysteine. Die Synthese von Dansyl-(PEG)₂-Cys(Far)OMe **30** ist in Abbildung 26 gezeigt.

Zuerst wurde Geranylgeraniol quantitativ mit *N*-Chlorsuccinimid und Dimethylsulfid zu Geranylgeranylchlorid **36** umgesetzt. Ohne weitere Aufarbeitung reagierte das Rohprodukt mit Cysteinmethylester Hydrochlorid unter basischen Bedingungen zu Cys(GerGer)-OMe **37**, das nach Reaktion mit Dansylchlorid Dansyl-Cys(GerGer)-OMe **38** ergab (Abbildung **29**).

Um fluoreszierendes K-Ras4B zu erhalten, wurde das gebundene GDP durch ein fluoreszierendes nicht hydrolysierbares GTP-Analogon (Mant-GppNHp: 2',3'- O-(*N*-Methylantraniloyl)guanosine-5'-O-((β,γ)-imido]triphosphat)) ausgetauscht.^[195] 18% des eingesetzten K-Ras4B **15** konnten mit Mant-GppNHp fluoreszent markiert werden. Der Nukleotidaustausch wurde von Dr. L. GREMER aus der Arbeitsgruppe von Prof. WITTINGHOFER durchgeführt.

4.3.3.2 Affinitätsmessungen

Das Prinzip der Fluoreszenzpolarisationsmessungen beruht auf der Anregung von Fluorophoren mit linear polarisiertem Licht. Nur Fluorophore, deren Dipolmoment parallel zur Polarisationsrichtung des Lichts liegt, werden angeregt. Wenn sie starr im Raum stehen, würden sie das Fluoreszenzlicht in derselben Ebene wieder emittieren. Da aber alle Moleküle in Lösung Rotationsbewegungen ausführen, wird auch die Ebene des emittierten Lichts gedreht. Für kleine, schnell rotierende Moleküle ändert sich die ursprüngliche photoselektive Orientierung stark bevor die Emission erfolgt, was in einem niedrigeren Polarisationsignal resultiert. Bindet das fluoreszenzmarkierte Molekül an einen Liganden, so hat der Komplex eine höhere Masse, was in der Regel zum Absinken der Rotationsgeschwindigkeit und damit der Erhöhung des Polarisationssignals führt.

Je größer das Volumen des fluorophormarkierten Peptids oder Proteins durch Komplexbildung wird, desto stärker ändert sich seine Rotationsdiffusion und somit auch die Fluoreszenzpolarisation. Bei Komplexbildung von zwei Bindungspartnern ähnlicher Größe kann es daher manchmal zu sehr geringen Änderungen der Fluoreszenzpolarisation kommen. Um dieses Problem bei den Messungen zwischen PDE δ und K-Ras4B, die beide mit 17 und 21 kDa eine ähnliche Größe besitzen, zu umgehen, wurde für die nachfolgenden Messungen ein Fusionsprotein aus PDE δ und GST (Glutathion-S-Transferase, 46 kDA) verwendet. PDE δ und PDE δ -GST wurden mit Pentapeptid **31** vermessen, um zu untersuchen, ob der für die Aufreinigung und für die Verbesserung des Signal zu Rauschverhältnis eingeführte GST-Tag die Bindung beeinflusst (siehe Tabelle 1).

Für die Affinitätsmessungen wurden eine 1 μM Lösung (30 mM Tris/HCl, 50mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 3 mM DTE) bezogen auf den Fluorophor des entsprechenden fluoreszierenden Peptids/Proteins vorgelegt und mit PDE δ -GST titriert. Für jede PDE δ -GST-Konzentration wurden mindestens 20 Polarisationsmesspunkte aufgenommen, gemittelt und gegen die entsprechende PDE δ -GST-Konzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte über nichtlineare Regression (Abbildung 30).

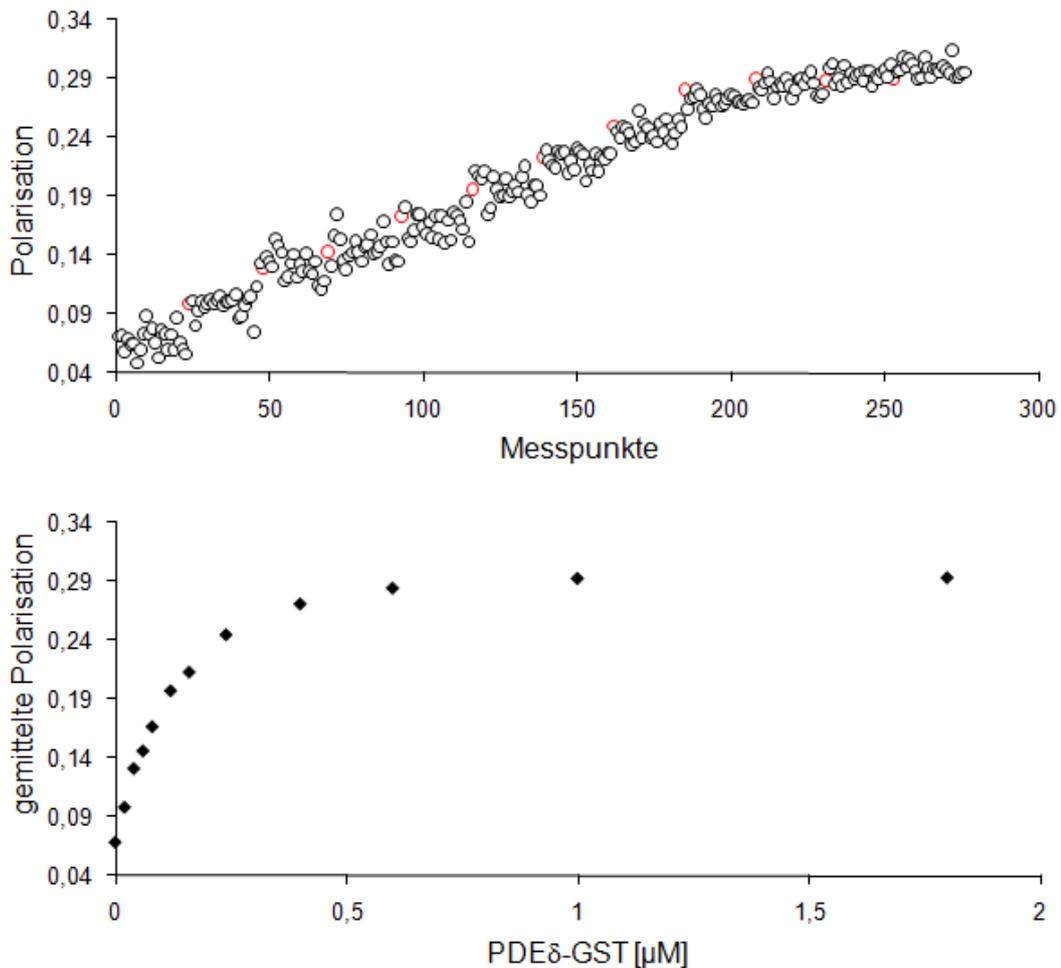


Abbildung 30: Schematische Darstellung der aus einer Polarisationsmessung erhaltenen Daten. **Oben:** Darstellung der einzelnen Polarisationswerte. Rote Kreise symbolisieren die Zugabe von weiterem PDE δ -GST. **Unten:** Gemittelte Polarisationswerte der entsprechenden PDE δ -GST-Konzentrationen, die gegen diese Konzentration aufgetragen und durch nicht-lineare Regression analysiert wurden.

Die Dissoziationskonstante (K_D) des PDE δ -GST Dansyl-Cys(Far)-OMe-Komplexes **35** betrug 890 nM, für das K-Ras4B Pentapeptid **31** sank sie hingegen auf 400 nM und

betrug insbesondere für das K-Ras4B Undecapeptid **32** nur noch 89 nM. Der K_D von semisynthetischem K-Ras4B lag mit 75 nM im selben Bereich.

Um zu bestimmen, ob der zusätzliche GST-Tag die untersuchten Bindungen stark beeinflusst, wurde das K-Ras4B Pentapeptid **31** darüberhinaus mit PDE δ titriert. Es zeigte sich, dass die Affinität mit einem K_D von 330 nM sehr ähnlich war und der GST-Tag die Bindung nicht beeinflusst.

Für das dansylmodifizierte, semisynthetische K-Ras4B **21** konnte keine eindeutige Interaktion mit PDE δ -GST nachgewiesen werden, obwohl das entsprechende Peptid **12** einen K_D von 108 nM besaß. Offensichtlich ist die polybasische Sequenz für die Interaktion zwischen PDE δ und K-Ras4B von entscheidender Bedeutung. Im PDE δ -GST-Peptid **12**-Komplex ist der N-Terminus des Peptids anscheinend so flexibel, dass das mit einem Dansyl-modifizierte zusätzliche Lysin die Bindung nicht sehr stark beeinflusst. Im PDE δ -GST-K-Ras4B **21**-Protein-Protein-Komplex scheint diese Flexibilität aber nicht mehr gegeben zu sein, sodass das Dansyl-modifizierte zusätzliche Lysin in der polybasischen Sequenz eine Interaktion verhindert.

	vs. PDE δ -GST	K_D [nM]
K-Ras4B:	Dansyl-Cys(GerGer)OMe 38	>20000
	Dansyl-Cys(Far)OMe 35	890
	Dansyl-(PEG) ₂ -Cys(Far)OMe 30	-*
	Dansyl-(PEG) ₂ -SKTKC(Far)OMe 31	400/ 330**
	Dansyl-GK ₆ SKTKC(Far)OMe 32	88
	C(StBu)K(Dansyl)K ₆ SKTKC(Far)OMe 12	108
	K-Ras4B Mant-GppNHp 15	75
	K-Ras4B (LysDansyl) 21	-***
N-Ras:	Dansyl-(PEG) ₂ -GC(StBu)MGVPC(Far)OMe 34	-*
	N-Ras Bodipy	1680
H-Ras:	Dansyl-(PEG) ₂ -C(StBu)MSC(StBu)KC(Far)OMe 33	-*
Rheb:	Rheb Mant-GppNHp	>1000****

Tabelle 1: Zusammenfassung der Dissoziationskonstanten (K_D) der unterschiedlichen Peptide und Proteine mit PDE δ -GST. * Micellenbildung der Peptide in Lösung verhinderte die Durchführung der Titrations. ** K_D zu PDE δ . ***Die Bestimmung eines spezifischen K_D s war aus dem Kurvenverlauf nicht möglich. ****Die Messung wurde von Dr. Y. CHEN durchgeführt.

Sowohl das Hexapeptid des H-Ras C-Terminus **33** als auch das Heptapeptid des N-Ras C-Terminus **34** ergaben ungewöhnliche hohe Startwerte für die Fluoreszenz-polarisation. Diese konnten durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln reduziert werden und lassen sich auf Micellenbildung zurückführen. Die Interaktion beider Peptide mit PDE δ -GST konnte daher nicht quantitativ beschrieben werden. Dasselbe gilt für Dansyl-NH-(PEG)₂-NH-Cys(Far)-OMe **30**, für das das oben aufgeführte Dansyl-Cys(Far)-OMe **35** verwendet wurde.

Weitere farnesylierte Proteine, wie ein Bodipy-modifiziertes N-Ras oder ein mit Mant-GppNHp beladenes Rheb, die von Dr. G. TRIOLA und Dr. Y. CHEN zur Verfügung gestellt wurden, werden von PDE δ -GST mit K_D-Werten von 1680 nM und >1000 nM gebunden.

Der geranylgeranylierte Cysteinmethylester **38** besitzt mit einem K_D von >20 μ M auch nur eine sehr geringe Affinität zu PDE δ -GST (Tabelle 1).

Im Gegensatz zu den Affinitätsmessungen zwischen den einzelnen Peptiden und PDE δ -GST ergaben sich bei Messungen mit Mant-GppNHp beladenem K-Ras4B **15** ungewöhnlich kleine Änderungen der Polarisationen. Diese sind reproduzierbar und lassen sich problemlos auswerten, stellen aber aufgrund des Signal-/Rauschverhältnisses hohe Anforderungen an konstante Messbedingungen.

4.3.4 Diskussion

Die Progression des K_D-Wertes von 890 nM für den farnesylierten Cysteinmethylester bis hin zu 89 nM für das Undecapeptid unterstreichen, dass PDE δ -GST den C-Terminus von K-Ras4B im Bereich der letzten 10-14 Aminosäuren erkennt. Dabei zeigt sich, dass Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen PDE δ -GST und der globulären Proteindomäne von K-Ras4B nur von geringer Bedeutung sind, da sowohl Mant-GppNHp beladenes K-Ras4B als auch das C-terminale Undecapeptid mit ähnlichen Affinitäten gebunden werden (Abbildung 31).

Diese Hypothese wird weiterhin durch die Affinität zu farnesyliertem N-Ras (K_D: 1680 nM) unterstützt. N-Ras besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu K-Ras4B, beide Proteine unterscheiden sich jedoch stark in ihrer C-terminalen Sequenz. Interessanterweise wird RheB, das keine ähnlich ausgeprägte Homologie hat, ebenfalls im mikromolaren Bereich gebunden. Dagegen scheint PDE δ -GST nur eine geringe Affinität zu geranylgeranylierten Proteinen zu besitzen, da der geranylgeranylierte Cysteinmethylester nur mit einem K_D von >20 μ M gebunden wird.

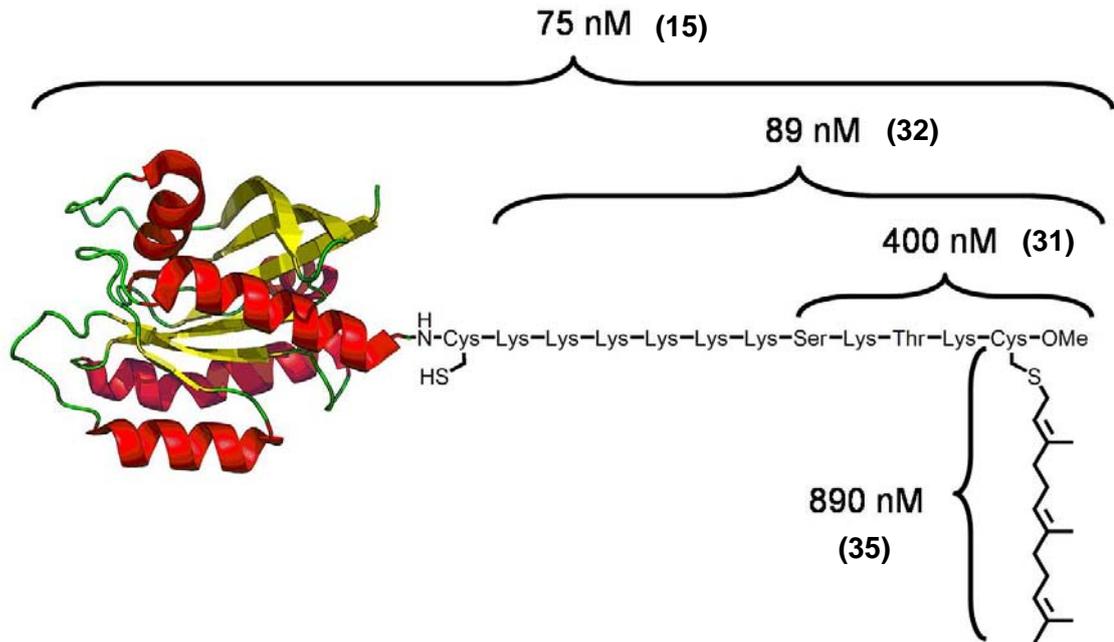


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Affinität (K_D) von PDE δ -GST gegenüber K-Ras4B mit besonderer Beachtung der C-terminalen Region. PDE δ -GST erkennt K-Ras4B über dessen C-Terminus ohne maßgebliche Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Protein-Korpus von K-Ras4B einzugehen.

Folglich ergibt sich folgendes Bild über die Funktion von PDE δ : PDE δ ist ein isoprenylbindendes Protein. Es kann farnesylierte Strukturen im mikromolaren Bereich erkennen und besitzt in Bezug auf den Isoprenylrest eine starke Präferenz für Farnesyl. Somit kann es als Shuttle-Protein für farnesylierte Proteine fungieren, indem es wahrscheinlich nur das farnesylierte Cystein dieser Proteine bindet. Spezifische Interaktion im nanomolaren Bereich bildet PDE δ aber nur mit dem polybasischen C-Terminus von K-Ras4B aus. Dies erklärt auch, warum in der Literatur so viele unterschiedliche isoprenylierte Bindungspartner identifiziert worden sind. Bei diesen Untersuchungen wurde mit Überexpressionstechniken und Yeast-two-Hybrid-Assays gearbeitet, die zu einer stark erhöhten Expression von PDE δ in der Zelle führten und dadurch zur Identifizierung unspezifischer, schwächerer Bindungspartner. Somit kann PDE δ zwei unterschiedliche Funktionen in Bezug auf isoprenylierte Proteine besitzen. Bei einer geringen Konzentration an PDE δ in der Zelle wirkt es für K-Ras4B als spezifischer Transportfaktor. Bei einer hohen Konzentration an PDE δ kann es die Membranverteilung verschiedenster farnesylierter Proteine wahrscheinlich relativ unspezifisch in der Form eines „Reset-Befehls“ beeinflussen.

Es ist nun nicht mehr die Frage, ob PDE δ mit unterschiedlichen Proteinen spezifisch interagiert, sondern wie hoch das PDE δ -Expressionslevel *in vivo* ist und welchen Veränderungen es unterliegen kann.

4.4 Biophysikalische Analyse der Membraninteraktion von K-Ras4B und seiner Analoga

K-Ras4B erreicht seine Membranassoziation, im Gegensatz zu H- und N-Ras durch zwei strukturell unterschiedliche Motive: Durch hydrophobe Wechselwirkungen des über einen Thioether gebundenen Farnesylrests und durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Lipiden der Plasmamembran und der polybasischen Sequenz des C-Terminus, die insgesamt aus 8 Lysinen besteht.^[20] Ob und wie aber der Anteil von negativ geladenen Lipiden in der Plasmamembran die Membranassoziation von K-Ras4B beeinflusst und welche Rolle dabei posttranslationale Modifizierungen, wie z.B. Carboxymethylierung oder Phosphorylierungen spielen, konnte bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden. Auch für die Frage ob K-Ras4B vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran transportiert wird, gibt es bis jetzt noch unterschiedliche Theorien.

In vitro-Assays zeigten, dass die Membranaffinität C-terminaler K-Ras4B Peptide stark mit der in die Membran eingebrachten Ladung ansteigt.^[196-197] Bei diesen Versuchen war die Dynamik der Membranassoziation mit Halbwertszeiten im Sekundenbereich sehr hoch. Eine Präferenz für strukturell unterschiedliche Lipide konnte nicht gefunden werden, die Bindung wird vielmehr durch den anionischen Charakter der Lipide bestimmt.^[196-198] Auch mit unterschiedlichen K-Ras4B-GFP-Chimären konnte die hohe Dynamik der Membranbindung nachgewiesen werden. Weiterhin konnte die laterale Diffusion innerhalb der Membran und die Abhängigkeit der Membranassoziation vom Vorhandensein negativer Lipide untersucht werden.^[199-200] Die K-Ras4B Fusionsproteine assoziieren konzentrationsabhängig mit „non-raft-sites“ der Plasmamembran, die die Inanspruchnahme spezieller Domänen und darüber hinaus spezifischer Rezeptoren suggerieren.^[201]

K-Ras4B wird am endoplasmatischen Retikulum posttranslational modifiziert. Für den Transport vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran werden drei unterschiedliche Möglichkeiten diskutiert. Aufgrund der *in vitro* Affinität von K-Ras4B zu Tubulin und polymerisiertem Tubulin sowie entsprechender *in vivo* Daten wird ein mikrotubuliabhängiger Transportprozess diskutiert.^[202-203] Im Kontext der Literatur zeigt sich hingegen, dass intakte Mikrotubuli vielmehr einen Anteil an der

Aufrechterhaltung der Verteilung von K-Ras4B an der Membran besitzen.^[204] Eine zweite Möglichkeit des Transportes besteht in der passiven Diffusion entlang eines elektrostatischen Gradienten. Sie basiert auf den Membranaffinitäten von poly-basischen, lipidierten Peptiden zu negativ geladenen Vesikeln und dem Nachweis, dass die Innenseite der Membran im Vergleich zu Endomembran-kompartimenten am stärksten negativ geladen ist. Die dritte diskutierte Möglichkeit ist ein bisher nicht identifiziertes Shuttle Protein.

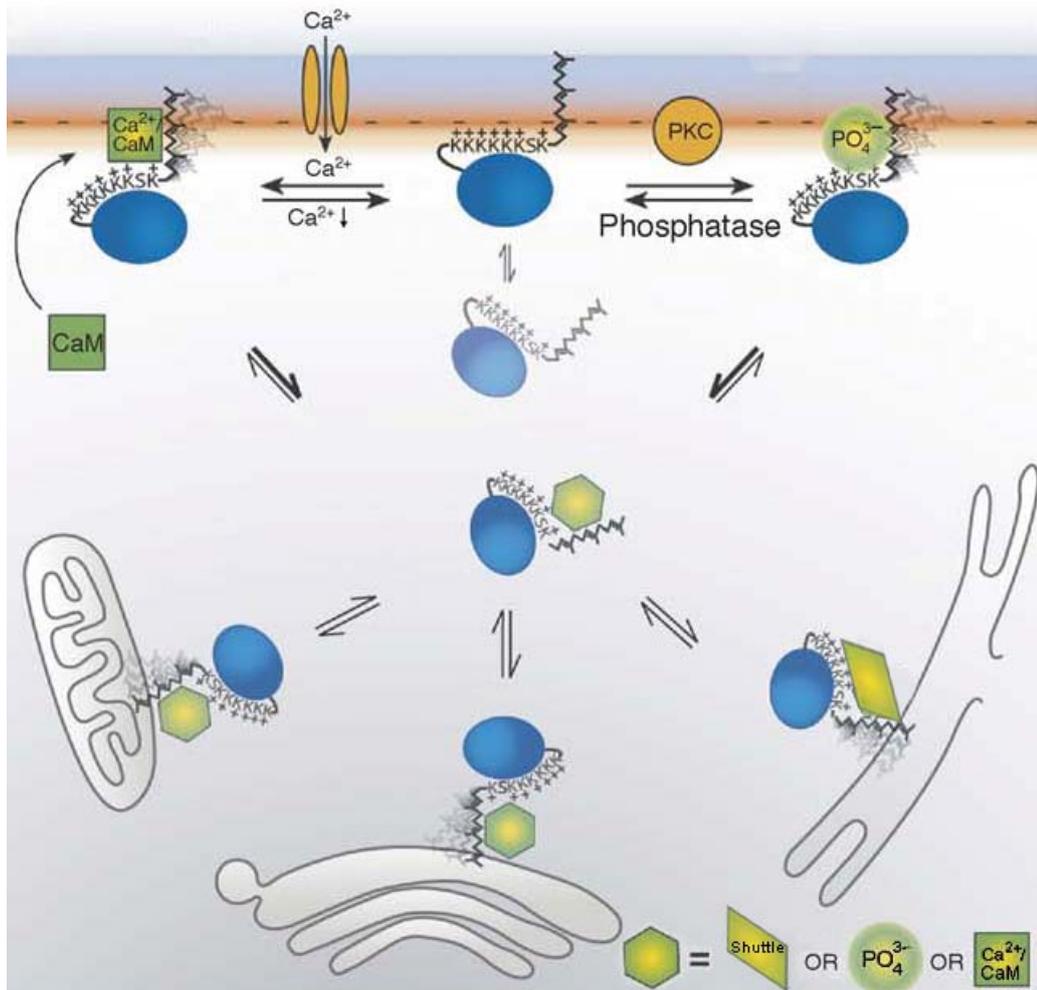


Abbildung 32: Schematische Darstellung der diskutierten Möglichkeiten für K-Ras4B zwischen einzelnen Membrankompartimenten zu wechseln. K-Ras4B gelangt nach der posttranslationalen Modifizierung am endoplasmatischen Retikulum entweder über Diffusion, mikrotubuliabhängig (hier nicht gezeigt) oder mit Hilfe eines Shuttle Proteins ($PDE\delta$) zur Plasmamembran. Es kann durch einen Ca^{2+} -abhängigen Calmodulin-Prozess bzw. durch Phosphorylierung die Plasmamembran verlassen und sich über unterschiedliche Endomembranen verteilen.

An der Plasmamembran angekommen, kann K-Ras4B durch zwei unterschiedliche Mechanismen wieder ins Cytoplasma gelangen und mit anderen Membrankompartimenten assoziieren. Die Dissoziation von K-Ras4B aus der Plasmamembran kann enzymatisch reguliert werden. Es wurde beobachtet, dass sich K-Ras4B Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig im Cytosol anreichert.^[25-26, 205] Dies geschieht wahrscheinlich durch die spezifische Interaktion der hypervariablen Region von K-Ras4B und der C-terminalen Domäne von Calmodulin in seinem Ca^{2+} -gebundenen Zustand.^[27-28] Außerdem konnte gezeigt werden, dass PKC K-Ras4B innerhalb der polybasischen Sequenz an Serin 181 phosphoryliert. Daraufhin dissoziiert es in einem sogenannten „electrostatic switch“^[74], der für K-Ras4B noch nicht näher biophysikalisch untersucht werden konnte, von der Plasmamembran und lagert sich an intrazelluläre Membranen an (Abbildung 32).^[24]

Die bisherigen *in vitro* Experimente zum Membranverhalten von K-Ras4B basieren lediglich auf Modellpeptiden, stellen somit nur ein unvollständiges Bild der Membranbindung dar und untersuchen nicht die interessanten posttranslationalen Modifizierungen darunter die Phosphorylierung von K-Ras4B. Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten können die bisher durchgeführten *in vivo*-Experimente eindeutiger diskutiert/interpretiert werden und der Versuch unternommen werden ein allgemeingültiges Modell für das Verhalten von K-Ras4B an der Plasmamembran und seinen Transport dorthin abzuleiten.

4.4.1 Untersuchung der Membraninteraktion unterschiedlicher K-Ras4B-Analoga mittels der Oberflächenplasmonenresonanz

Für die Charakterisierung des Membranverhaltens der synthetisierten Proteine wurde die Oberflächenplasmonenresonanz gewählt. Mit ihr ist es möglich, im Biacore™-System die Interaktion zwischen einer immobilisierten Lipiddoppelschicht und den entsprechenden Proteinen bezüglich ihrer Assoziation und Dissoziation zu quantifizieren. Der Sensorchip des Biacore™-Systems besteht aus einer dünnen, vergoldeten Glasschicht. Bei Totalreflexion von polarisiertem Laserlicht an der Grenzschicht zwischen Glas und Gold wird ein Teil des Lichts durch Anregung der Oberflächenplasmonen absorbiert. Der Einfallswinkel, unter dem ein Minimum an reflektiertem Licht gemessen wird, heißt Resonanzwinkel. Er ist abhängig vom Brechungsindex der Goldschicht. Dieser wird wiederum durch die Anlagerung von Makromolekülen beeinflusst.^[206-207] Das Biacore-Gerät misst die Verschiebung des Resonanzwinkels in RU (dimensionslose relative Einheiten; $1000 \text{ RU} = 0,1^\circ$). Die Goldoberfläche des

Chips kann für die Bindung von unterschiedlichen Molekülen, wie Proteinen und Lipiden, modifiziert werden (Abbildung 33).

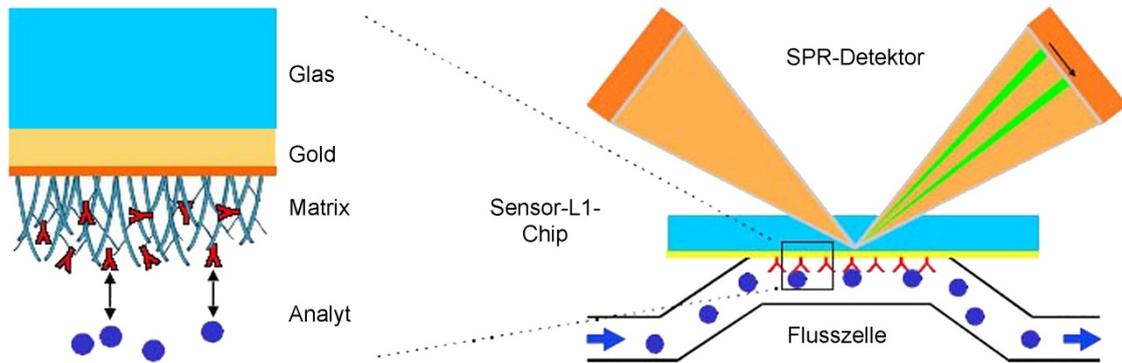


Abbildung 33: Prinzip einer Oberflächenplasmonenresonanz-Messung und grundlegender Aufbau eines Biacore™ Gerätes mit entsprechendem Sensorchip. **Links:** Der Sensorchip besteht aus einem Prisma, welches auf einer Glasfläche angebracht ist. Die Glasoberfläche ist mit einer dünnen Metallschicht bedampft und trägt eine Matrix, die einen Analyten besonders gut bindet. **Rechts:** Bei der Anlagerung von Molekülen ändert sich der Brechungsindex an der Metall-Matrix Grenzfläche. Gemessen wird, die durch diese Änderung herbeigeführte Verschiebung des Resonanzwinkels, unter dem ein Minimum an reflektiertem Licht beobachtet wird.

Zum Aufbau artifizierender Membranen im Biacore™-System eignen sich L1-Sensorchips. Diese tragen eine lipophil modifizierte, carboxymethylierte Dextranschicht. Unilamellare Lipidvesikel adsorbieren spontan an die Oberfläche und inkorporieren die hydrophoben Seitenketten.^[193] Die Vesikel werden dadurch nicht-kovalent an den Chip gebunden.

Die großen unilamellaren Lipidvesikel (Large Unilamellar Vesicles, LUV), die für die Untersuchungen benutzt wurden, bestehen sowohl aus ungeladenen 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) als auch aus zwei unterschiedlichen Mischungen von POPC und dem negativ geladenen 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-(-phospho-L-serin) (POPS). Die entsprechenden ungeladenen bzw. negativ geladenen Lipidvesikel wurden durch Frier-Tau-Zyklen und Extrusion durch einen Filter mit einer Porengröße von 100 nm hergestellt. Nach Aufbringen der entsprechenden artifizierender Membranen auf die Oberfläche des L1-Sensorchips wurden die unterschiedlichen Proteinlösungen mit einer Konzentration von 2 μM in einem Laufpuffer (10 mM Hepes, 5 mM MgCl_2 , 150 mM, pH 7.4) bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 2 min über die artifizierende Membran gespült um die Assoziation zu beobachten und danach für weitere 30 min mit Laufpuffer gespült um die Dissoziation der Proteine zu beobachten. Dabei wurde für jede

Proteinmessung die artifizielle Membran auf dem L1-Chip neu immobilisiert, indem eine entsprechend präparierte Lösung aus Lipdivesikeln über den Chip gespült wurde. Jede Messung wurde mindestens 3-mal durchgeführt.

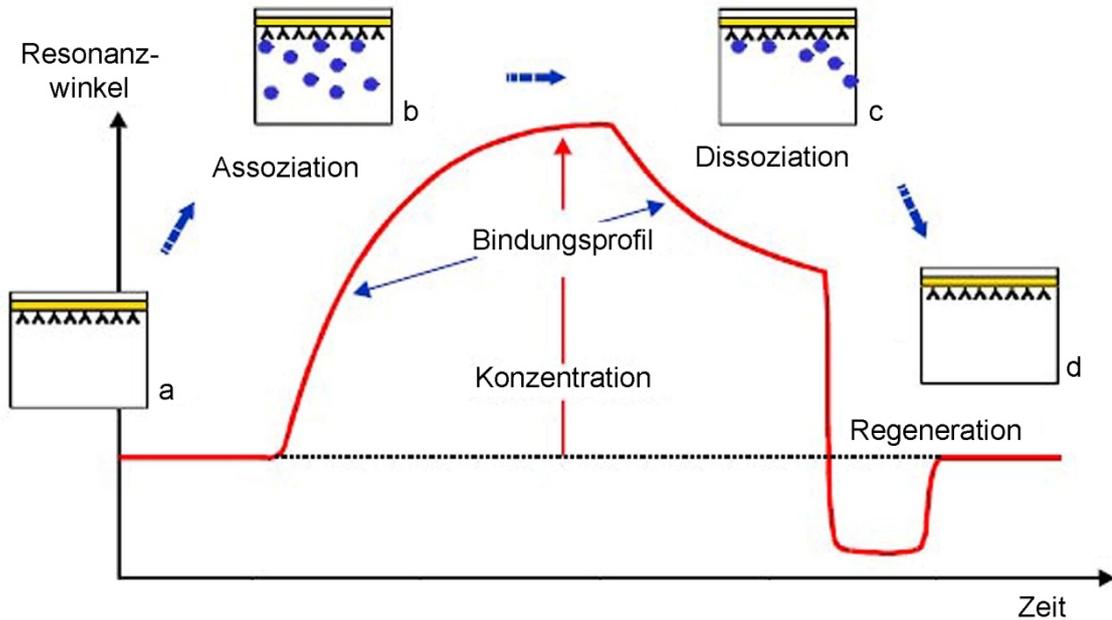


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Messkurve eines SPR-Experiments. An einem Sensorchip, auf dem eine künstliche Membran immobilisiert wurde (a), assoziiert ein Analyt, der über den Chip gespült wird (b). Die Dissoziationsphase des immobilisierten Analyten wird durch spülen der Oberfläche mit Puffer eingeleitet (c). Der Sensorchip kann mit Detergentien wieder regeneriert und eine neue Membran immobilisiert werden (d). Aus dem Kurvenverlauf lassen sich durch die konzentrationsabhängige Sättigung der Bindungsstellen (roter Pfeil) die Affinitätskonstante K_D (Langmuir-Modell) sowie die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation und Dissoziation k_{ass} bzw. k_{diss} berechnen (blauer Pfeil).

Für diese Untersuchungen wurden K-Ras4B **15**, phosphoryliertes K-Ras4B **17**, K-Ras4B **16**, dessen Serin 181 durch eine Glutaminsäure ausgetauscht wurde, das K-Ras4B Analogon **19** ohne Carboxymethylierung, ein nicht farnesyliertes K-Ras4B Analogon **20** und farnesyliertes H-Ras **25** verwendet.

Die Messungen wurden an einer ungeladenen POPC Membran und an negativ geladenen Membranen bestehend aus 80% POPC und 20% POPS bzw. 60 % POPS und 40% POPS durchgeführt. Für die Auswertung wurde anfänglich versucht, das komplette Bindungsprofil (Abbildung 34) mit der Langmuir-Funktion zu beschreiben, um eine absolute Bindungskonstante der Proteine zu den einzelnen Membransystemen zu berechnen. Dabei stellte sich heraus, dass der Kurvenverlauf den gewählten Modellen nicht entsprach (Abbildung 35). Weiterhin waren die Messungen

aufgrund ihrer Konzentrationsabhängigkeit so unterschiedlich, dass die Bestimmung einer absoluten Affinität nicht möglich war. Die großen Konzentrationsschwankungen lassen sich darauf zurückführen, dass die Messungen teilweise mehr als 24 Stunden dauerten und die Proteinlösungen gekühlt bei 13°C im Autosampler des Biacore™-Gerätes gelagert werden mussten.

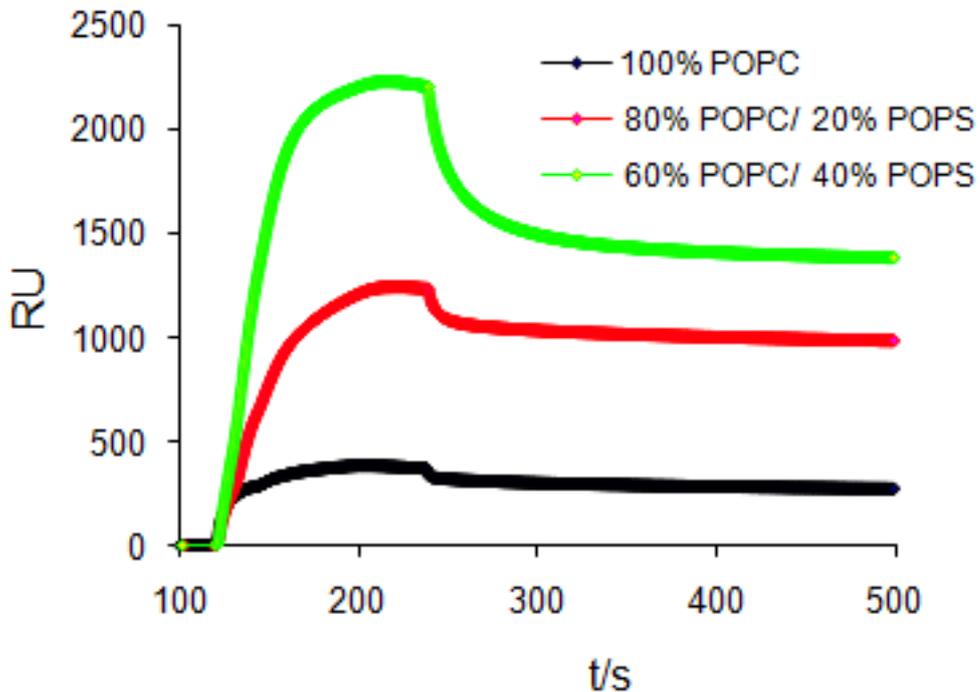


Abbildung 35: Normalisierte Darstellung aufgenommener Sensogramme der Interaktion von K-Ras4B 15 mit unterschiedlich negativ geladenen Membranen. Mit steigender negativer Ladung nimmt auch die Menge des an der Membran adsorbierten Proteins zu. Für die letztendliche Auswertung sind sowohl die Anfangssteigung als auch die ersten 120 Sekunden der Dissoziationsphase von Bedeutung.

Um eine relative quantitative Beschreibung der Membranaffinitäten der Proteine und ihren Vergleich untereinander zu ermöglichen, wurden nur die konzentrationsunabhängige Dissoziation und die Anfangssteigung der Assoziation, die in erster Näherung konzentrationsunabhängig ist, in Betracht gezogen. Dabei zeigte sich, dass die vollständige Dissoziationsphase durch kein sinnvolles mathematisches Modell angenähert werden konnte. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Dissoziation nach einem gewissen Zeitpunkt sehr stark durch die Rückbindung der schon dissoziierten Proteine beeinflusst ist und dadurch zu einem Multi-Parameter Ereignis wird. In Übereinstimmung mit der Annahme, dass K-Ras-Proteine aufgrund ihrer zwei

unterschiedlichen Membrananker auch einen zweistufigen Dissoziationsprozess durchlaufen, konnten die ersten 120 Sekunden der Dissoziation mit einer biexponentiellen Funktion sehr gut angenähert werden. Dadurch wird die Auswertung durch die Rückbindung, die besonders die späte Dissoziationsphase dominiert, nicht stark beeinflusst. Die beiden erhalten Dissoziationskonstanten werden nach ihrem Anteil am Dissoziationsprozess gewichtet und zu einer Konstanten zusammengefasst um einen einfacheren Vergleich untereinander zu ermöglichen. Im Folgenden wird nur noch diese zusammengefasste Dissoziationskonstante (K_{Diss}) verwendet.

Für die Auswertung der Anfangssteigung wurde eine lineare Regression verwendet. Aus Gründen des besseren Verständnisses werden zuerst die Ergebnisse der Dissoziation beschrieben. Es soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass es sich hier nur um relative Dissoziations- und Assoziationskonstanten handelt (siehe oben), die aber für den Vergleich untereinander sehr gut geeignet sind.

Die Dissoziation von polybasischem K-Ras4B **15** ist vom Anteil negativer Ladung in den künstlichen Membranen abhängig. Mit 0.40 RU*s^{-2} besitzt es die höchste Tendenz aus ungeladenen Membranen zu dissoziieren. Mit zunehmendem negativem Ladungsanteil in der Membran von 20% bzw. 40% sinkt die Dissoziationskonstante auf 0.16 bzw. 0.07 RU*s^{-2} und zeigt somit die langsamste Dissoziation für alle K-Ras Analoga. Im Gegensatz dazu zeigt phosphoryliertes K-Ras4B **17** einen gegenläufigen Trend. Für ungeladene POPC-Membranen besitzt es mit einer K_{Diss} von 0.10 RU*s^{-2} die stärkste Membranbindung. Zusätzliche negative Ladung in der Membran führt zu einer Destabilisierung der Bindung, was sich in einer erhöhten K_{Diss} mit 0.16 bzw. 0.30 RU*s^{-2} äußert. Für K-Ras4B **16**, dessen Serin 181 durch eine Glutaminsäure ausgetauscht wurde, zeichnet sich kein eindeutiger Trend für die K_{Diss} -Werte ab. Sowohl zu ungeladenen als auch zu 20% negativ geladenen Membranen ist die Dissoziation mit einer K_{Diss} von 0.18 bzw. 0.23 RU*s^{-2} sehr hoch und stabilisiert sich erst bei 40% negativ geladenen Membranen mit einem K_{Diss} von 0.12 RU*s^{-2} , der immer noch doppelt so hoch ist wie für K-Ras4B **15**. Für alle gemessenen Membransysteme besitzt K-Ras4B **19**, dem die Carboxymethylierung fehlt, mit einem K_{Diss} zwischen 0.23 und 0.30 RU*s^{-2} eine sehr hohe Dissoziationsrate, die keinen Trend aufweist. Auch das unfarnesylierte K-Ras4B **20** besitzt mit Dissoziationskonstanten über 1 RU*s^{-2} , die außerhalb der Messgrenzen für das Biacore™-System liegen, eine kaum nachweisbare Affinität zu den einzelnen Membransystemen. Farnesyliertes H-Ras **25** zeigt zwar den schon für K-Ras4B beobachteten Trend, geht aber mit Dissoziationskonstanten von 1.0 , 0.39 und 0.32 RU*s^{-2} für Membranen mit 0%, 20% und 40% negativer Ladung zu keiner Zeit eine „stabile Bindung“ ein (Abbildung **36**).

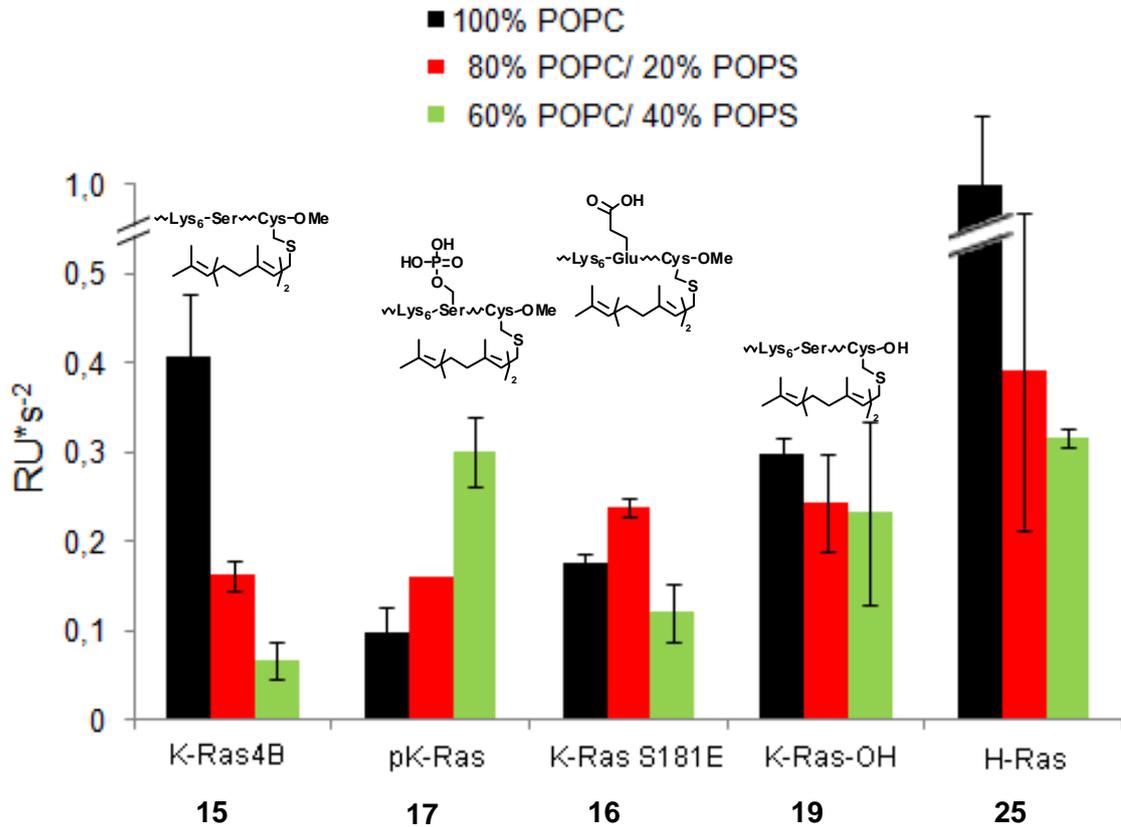


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Dissoziationskonstanten von H-Ras 25, K-Ras4B 15 und Analoga zu neutralen und negative geladenen Membranen. Die Dissoziationskonstante von K-Ras4B 15 sinkt mit zunehmend negativer Ladung in der Membran, im Gegensatz zum phosphoryliertem Analogon 17. Die weiteren Analoga und H-Ras 25 zeigen keinen interpretierbaren Trend.

Die Auswertung der Anfangssteigungen zeichnet ein ähnliches Bild: Die entsprechenden Assoziationskonstanten (K_{Ass}) besitzen aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit einen bedeutend höheren Fehler. Alle Proteine zeigen die Tendenz mit zunehmender Ladung schneller mit den entsprechenden Membransystemen zu assoziieren. Für K-Ras4B 15 ist dieser Trend besonders ausgeprägt. Die K-Ras-Proteine 16 und 17 sowie H-Ras 25 zeigen noch schnelle Assoziationskinetiken. Dagegen weist 19 kaum noch eine Tendenz in die gemessenen Membranen zu insertieren (Abbildung 37) auf. Die Daten der Assoziationskinetik sind hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt, da sie aufgrund schon erwähnter messtechnischer Gegebenheiten nur bedingt für Interpretation zu gebrauchen sind. Daher wird in der folgenden Diskussion hauptsächlich auf die Dissoziationskinetiken eingegangen. Diese Messungen wurden mit der Unterstützung von M.Sc A. GOHLKE durchgeführt.

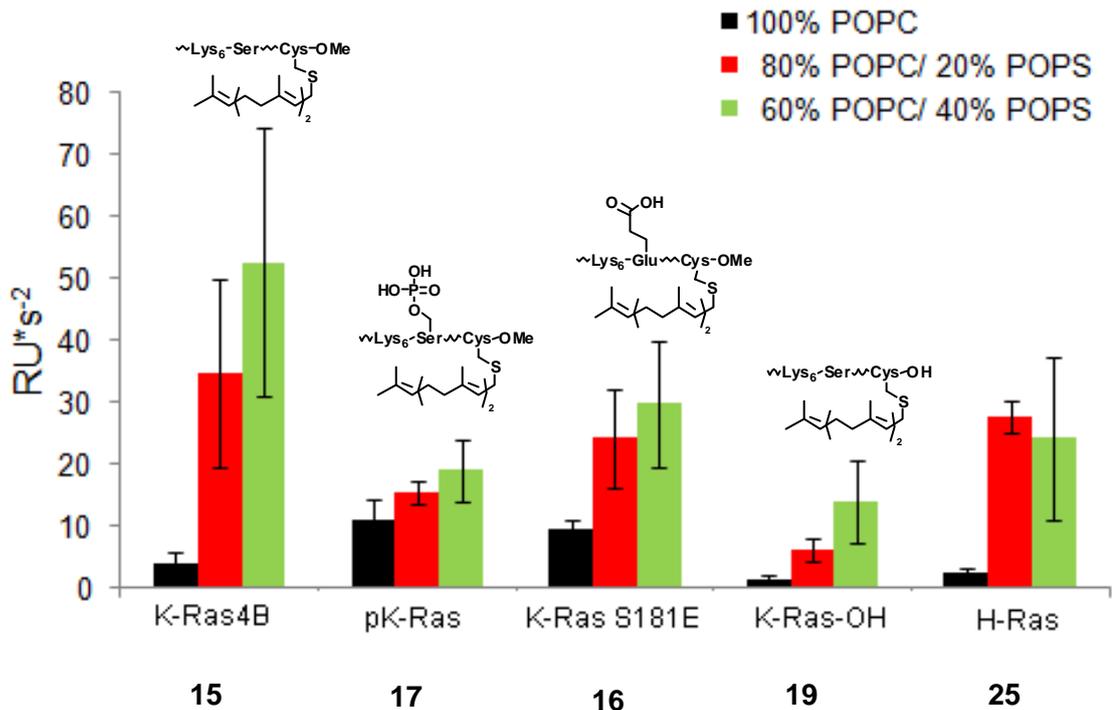


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Assoziationskonstanten von H-Ras 25, K-Ras4B 15 und seiner Analoga zu neutralen und negativ geladenen Membranen. Die Assoziationskonstanten aller gemessenen Proteine steigen mit zunehmender negativer Ladung in der Membran. Dabei ist der Effekt für K-Ras4B 15 am deutlichsten, während er für das phosphorylierte Analogon 17 und K-Ras4B ohne Carboxymethylierung 19 am schwächsten ist.

4.4.2 Diskussion

Sowohl K-Ras4B 15 als auch phosphoryliertes K-Ras4B 17 zeigen die erwarteten Abhängigkeiten in ihren Dissoziationskinetiken. Mit zunehmender negativer Ladung in der Membran sinkt die Dissoziationsrate für K-Ras4B 15, während sie für phosphoryliertes K-Ras4B 17 entsprechend ansteigt. Die *in vitro* Daten zeigen deutlich, dass die Membranverteilung von K-Ras4B durch die Phosphorylierung stark verändert wird. Phosphoryliertes K-Ras4B 17 verliert seine Affinität zu negativ geladenen Membranen. Die Phosphorylierung ermöglicht jedoch die Assoziation mit ungeladenen Membranen mit einer Stabilität, die vergleichbar mit der von K-Ras4B 15 zu negativ geladenen Membranen ist.

Überraschend ist die fast lineare Abhängigkeit der Dissoziationsrate von der eingebrachten negativen Ladung. Basierend auf Versuchen mit Modellpeptiden wurde in der Literatur eine eher exponentielle Abhängigkeit gemessen.^[196-197] Dies zeigt, dass semisynthetische Proteine ein bedeutend schärferes Bild der Membranbindung

zeichnen können, als es Modellpeptide tun. Ursache dafür sind die attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen des Proteins.

K-Ras4B **16**, dessen Serin 181 durch eine Glutaminsäure ausgetauscht wurde, das laut Literatur phosphoryliertes K-Ras4B imitieren soll,^[24] besitzt in Bezug auf seine Membranaffinität ein Verhalten, das eher zwischen diesen beiden Proteinen liegt. Zurückzuführen ist das auf die unterschiedlichen pK_s -Werte des Phosphats und der Carbonsäure. Unter physiologischen Versuchsbedingungen bei pH 7.4 ist die Carbonsäure nicht so stark dissoziiert wie die Phosphatgruppe und kann daher nicht das entsprechende elektrostatische Abstoßungspotential entfalten. Aufgrund dieser Tatsache zeigt sich, dass besonders für die Untersuchung des Membranverhaltens Glutaminsäureanaloge keinen adäquaten Ersatz für Phosphate darstellen.

Die hohen Dissoziationsraten für nicht carboxymethyliertes K-Ras4B **19** zeigen, wie wichtig diese posttranslationale Modifizierung für die Membranaffinität ist. Dabei ist erstaunlich, dass die unterschiedliche Position der Carbonsäure im Vergleich zum Glutaminsäureanalogon **16** signifikant höhere Dissoziationskonstanten bewirkt. Dies liegt wahrscheinlich an der starren Verknüpfung der freien Carbonsäure und des Farnesylrestes bei **19**. Wenn die Carbonsäure über eine Seitenkette und nicht direkt mit dem Proteinrückgrat verknüpft ist, bleibt die Möglichkeit, die elektrostatische Abstoßung durch die Flexibilität der Seitenkette zu minimieren.

Die schnelle Dissoziation von farnesyliertem H-Ras **25** aus den untersuchten Membransystemen legt dar, dass Proteine mit nur einem Membrananker keine stabile Membranassoziiierung erlangen können. Im Vergleich zu nicht farnesyliertem K-Ras4B **20** zeigt sich, dass der Farnesylrest und die polybasische Sequenz nicht als gleichwertige Ankersysteme betrachtet werden können. Während das nicht farnesylierte K-Ras-Analogon **20** mit Dissoziationskonstanten $< 1 \text{ RU} \cdot \text{s}^{-2}$ auch für die negativ geladenen Membransysteme keine stabile Membranbindung besitzt, ist bei H-Ras ein eindeutiger Trend zu beobachten. Da beide Proteine sich nur in ihrem C-Terminus unterscheiden, lässt sich dieser Unterschied auf den Vergleich von Farnesylrest und polybasischer Sequenz als Ankermotiv reduzieren. Scheinbar hat die polybasische Sequenz von K-Ras einen bedeutend geringeren Anteil an der stabilen Membranbindung als z.B. der Farnesylrest oder der Palmitoylrest, der bei H- und N-Ras eine stabile Membranverankerung bewirkt. Interpretiert man auf Basis der erhaltenen Ergebnisse die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von K-Ras4B in Bezug auf den Transport zur Plasmamembran, so ist ein diffusionsgetriebenes, elektrostatisches Modell nicht mehr haltbar. Die annähernd lineare Abhängigkeit der Membrandissoziation von negativer Ladung von K-Ras4B würde eine so starke Akkumulierung von K-Ras4B an der Plasmamembran, wie sie in *in vivo* Experimenten

gefunden wurde, nicht erlauben.^[22] Vielmehr wäre eher eine Verteilung über unterschiedliche Endomembranen wie z.B. der Membran des endoplasmatischen Retikulums zu erwarten. Allein um die Membran des endoplasmatischen Retikulums zu verlassen um zur Plasmamembran zu diffundieren, müsste ein sehr großer Unterschied zwischen den Dissoziationsraten für beide Membrankompartimente vorhanden sein. Dies lässt sich vielmehr durch einen gerichteten Transport erklären. Dabei könnte PDE δ die Funktionen eines solchen Shuttle-Proteins übernehmen. K-Ras4B hat eine höhere Affinität zu PDE δ als z.B. zu ungeladenen Membranen. Dadurch kann es entweder in einem aktiven Prozess aus solchen Membranen von PDE δ extrahiert werden, oder aber in einem passiven Prozess mit PDE δ assoziieren, nachdem es aus der Membran dissoziiert ist. PDE δ solubilisiert dann K-Ras4B im Cytoplasma. Wenn dieser Komplex in die Nähe von negativen geladenen Membrankompartimenten kommt, zu denen K-Ras4B eine höhere Affinität besitzt, zerfällt der K-Ras4B-PDE δ -Komplex und es assoziiert mit diesen. So lassen sich auch die Verteilung von phosphoryliertem K-Ras und seinem Glutamisäureanalogon erklären. Hier unterstützen die erhaltenen Dissoziationsdaten die *in vivo* Beobachtungen. Es kommt zu einer der Membranaffinität entsprechenden Verteilung der Proteine über alle Membrankompartimente. Eine solche Verteilung würde man auch für K-Ras4B erwarten, wenn kein Shuttle-Protein die Akkumulierung an der Plasmamembran unterstützen würde.

Basierend auf den *in vitro* Daten für die Membranaffinität von K-Ras4B Proteinen und seinen Analoga, konnte gezeigt werden, dass der Transport von K-Ras4B wahrscheinlich kein diffusionsgetriebener, elektrostatischer Prozess ist, sondern vielmehr auf der Interaktion mit einem Shuttle-Protein wie PDE δ basiert.

4.4.3 Rasterkraftmikroskopie-Untersuchungen des Membranverhaltens von K-Ras4B

Es wird angenommen, dass K-Ras4B zu sogenannten Nanoclustern in der Membran aggregiert. Als eine Funktion des Nanoclusterings wird eine digitale Signaltransduktion, ähnlich der digitalen Signalübertragung, diskutiert. Die Signalantwort ist dann unabhängig von der ursprünglichen Aktivierung. Jedes ankommende Signal, das über einem gewissen Schwellenwert liegt, führt zur maximalen Signalweiterleitung.^[208-209]

Für K-Ras4B G12V, eine konstitutiv aktive Mutante, konnte die Aggregation in Nanoclustern mit einem Durchmesser von 6-8 nm, in denen bis zu 8 K-Ras4B-Proteinen vorhanden sind, nachgewiesen werden. Das Auftreten solcher Nanocluster

ist unabhängig vom Vorhandensein von Cholesterol in der Plasmamembran, findet also in sogenannten „non-raft“-Phasen statt. Die Bildung von Nanoclustern benötigt aber das intakte Aktin Zytoskelett und ist Voraussetzung für die Signaltransduktion von K-Ras4B.^[208, 210] Für die Bildung der Nanocluster rekrutiert GTP-beladenes K-Ras4B Galectin-3 an die Plasmamembran, wo es ein integraler Bestandteil dieser wird.^[211] Neucleophosmin und Nucleolin sind weitere Proteine, die an der Bildung von K-Ras4B Nanoclustern beteiligt sind.^[212] Für die Signaltransduktion wird auch Raf-1 von K-Ras4B-GTP an diese Nanocluster rekrutiert. Deren Entstehung wird durch die Phosphorylierung des K-Ras4B C-Terminus verhindert.^[213] Interessanterweise wird aber die *in vivo*-Interaktion von K-Ras4B und Galectin-3 nicht durch die Phosphorylierung reguliert.^[213]

K-Ras4B Nanocluster wurden bis jetzt *in-silico* und *in-vivo* mit indirekten Methoden untersucht.^[210] Semisynthetisches K-Ras4B **15** ermöglicht es nun, das Membranverhalten von K-Ras4B in Bezug auf die laterale Verteilung und das Nanoclustering in künstlichen Membranen direkt mittels Rasterkraftmikroskopie zu untersuchen.

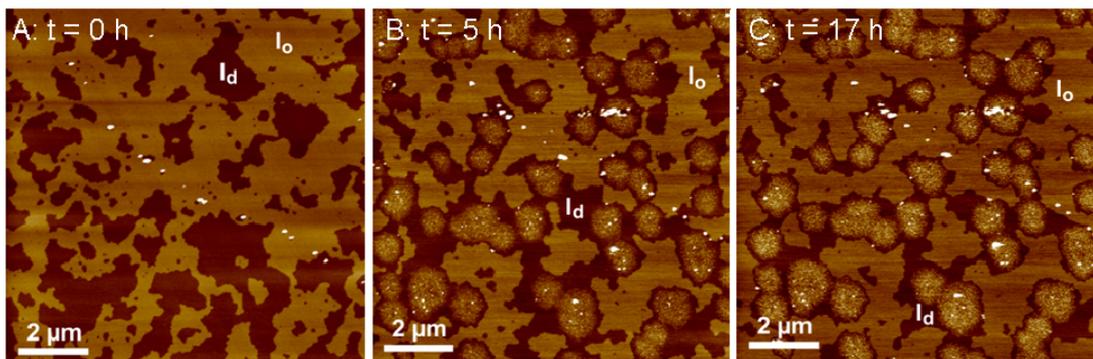


Abbildung 38: AFM Abbildungen der zeitabhängigen Verteilung von K-Ras4B **15** in einer künstlichen Lipiddoppelschicht, bestehend aus DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol (20:5:45:5:25). Der Maßstab der Membranabbildungen reicht von 0 nm (dunkelbraun) bis 6 nm (weiß). Die Bilder wurden vor der Injektion (**A**), 5h (**B**) und 17h (**C**) nach der Injektion von 200 µl einer 2 µM K-Ras4B **15** Pufferlösung (20 mM Tris, 7 mM MgCl₂, pH 7.4) in die AFM Flusszelle im „tapping mode“ aufgenommen. **A:** Die Membranabbildung zeigt eine homogene Lipiddoppelschicht mit koexistierenden *l_o*- und *l_d*-Phasen. **B+C:** Die Abbildung zeigt denselben Membranausschnitt nach 5h und 17h Inkubation mit einer K-Ras4B Lösung. Die *l_o*- und *l_d*-Phase koexistieren weiterhin unverändert über die beobachtete Zeit in Form und Größe. In der *l_d*-Phase hat sich eine weitere Phase, die mit Protein angereichert ist, ausgebildet

Dabei stellte sich die Frage, ob das in der Literatur beschriebene Auftreten von Nanoclustern durch *in vitro*-Experimente mit Modellmembranen nachgewiesen werden

kann. Die dafür entsprechenden AFM-Untersuchungen wurden von Dr. K. WEISE durchgeführt. Diese AFM-Messungen wurden in einer aus koexistierenden flüssig-flüssig Phasen bestehenden Doppelschichtmembran aus DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol (DOPC: 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin; DOPG: 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol); DPPG: 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol; DPPC: 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin; Chol: Cholesterol) in einem molaren Verhältnis von 20:5:45:5:25 durchgeführt.

Die homogene künstliche Doppelschichtmembran besteht aus isolierten Inseln einer fluiden „liquid disorder“-Phase (I_d), die wiederum in eine „raft-like liquid ordered“-Phase (I_o) eingebettet ist. Diese Modellmembran enthält insgesamt 10% negativ geladene Lipide. Die einzelnen Membranphasen der Modellmembran lassen sich durch ihr Höhenprofil in AFM-Messungen deutlich unterscheiden. Die Membrandicke der I_d -Phase liegt bei ca. 4 nm und für die I_o -Phase bei ca. 5.2 nm. Dieser Größenunterschied ist ausreichend, um beide Phasen voneinander unterscheiden zu können (Abbildung **38** und **39**).^[164, 214]

Die Interaktion von semisynthetischem K-Ras4B **15** mit der negativ geladenen künstlichen Doppelschichtmembran wurde gemessen indem eine K-Ras4B-Lösung in die AFM-Messzelle injiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Membranoberfläche mittels des AFM „tapping modes“ anhand ihres Höhenprofils analysiert wurde. Zum Zeitpunkt $t = 0h$ konnte das biphasische Membransystem ohne K-Ras4B Protein charakterisiert werden. Nach der Zugabe von K-Ras4B-Lösung wurde derselbe Membranbereich nach 5h und 17h charakterisiert und die Insertion des Proteins in die einzelnen Membranphasen untersucht (Abbildung **38**).

Das inkubierte K-Ras4B **15** ist nur in der I_o -Phase lokalisiert und kann durch eine Veränderung des Höhenprofils von 2.0 ± 0.7 nm nachgewiesen werden, was näherungsweise der linearen Dimension eines K-Ras4B Proteins entspricht. Die Zugabe von K-Ras4B **15** hat die Zusammensetzung der künstlichen Doppelschichtmembran in Bezug auf die laterale Organisation der koexistierenden I_d - und I_o -Phasen sowie ihrer Form und Größe beeinflusst. Die vorher in kleine Abschnitte unterteilten Membranphasen sind nun zu größeren zusammenhängenden I_d - und I_o -Phasen fusioniert. Weiterhin ist eine K-Ras4B induzierte Domänenbildung innerhalb der I_d -Phase zu beobachten. Die Ausdehnung dieser Domänen, in denen K-Ras4B angereichert ist, liegt im Bereich von mehreren hundert Nanometern bis hin zu einem Micrometer. Sie sind im Profil 0.9 ± 0.1 nm höher als die reine I_d -Phase (Abbildung **39**).

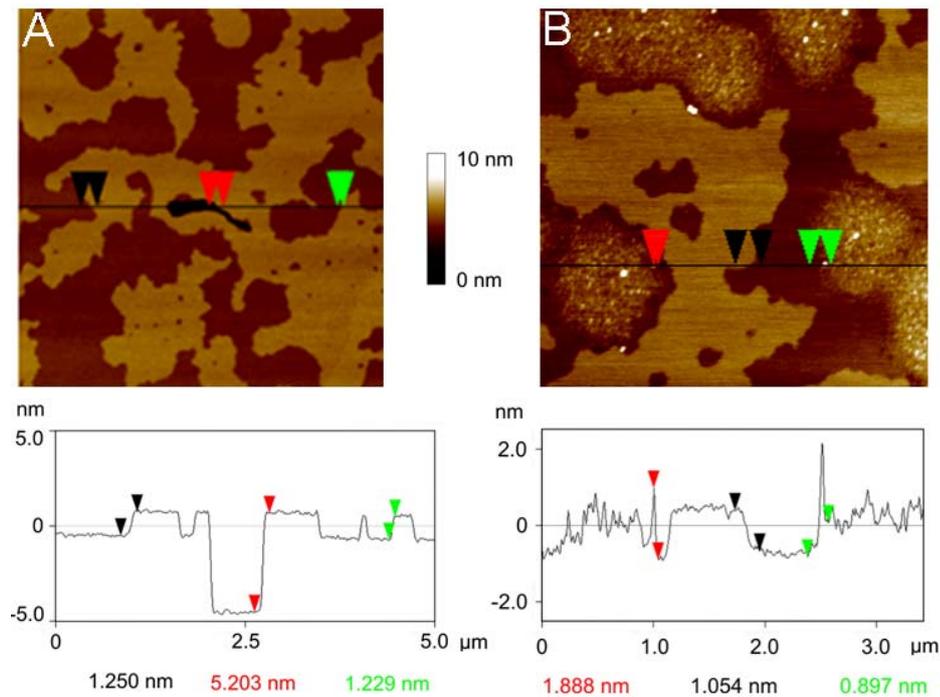


Abbildung 39: AFM-Abbildungen der Membran bestehend aus DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol 20:5:45:5:25 vor der Inkubation mit K-Ras4B (A) und nach 5h Inkubation (B). Der Maßstab der Membranabbildungen reicht von 0 nm (dukelbraun) bis 10 nm (weiß). Entlang der schwarzen Linie wurde ein Höhenprofil der Membran aufgenommen, aussagekräftige Punkte mit farbigen Pfeilen markiert und ihr vertikaler Höhenunterschied bestimmt. **A:** Die Membranabbildung zeigt eine homogene Lipiddoppelschicht (vertikale Höhe 5.2 nm im Vergleich mit einer Defektstelle; rote Pfeile) mit koexistierenden I_o - und I_d -Phasen (vertikaler Höhenunterschied 1.2 nm; schwarze und grüne Pfeile). **B:** Die Membranabbildung zeigt die gleiche Membran nach 5h Inkubation mit einer K-Ras4B-Lösung. Es koexistieren jetzt eine I_o - und I_d -Phase (vertikaler Höhenunterschied 1.1 nm und 0.9 nm; schwarze und grüne Pfeile). In der I_d -Phase hat sich eine weitere Phase ausgebildet, die mit Protein angereichert ist (vertikaler Höhenunterschied 1.8 nm; rote Pfeile).

4.4.4 Diskussion

In den gemachten AFM-Studien konnte die Bildung von sogenannten Nanoclustern, wie sie in der Literatur beschrieben werden, nicht beobachtet werden. Vielmehr kommt es wahrscheinlich durch einen Lipid-Sortierungsmechanismus zur Ausbildung einer neuen fluiden Mikrodomäne mit einem höheren Anteil negativ geladener Lipide und inkorporiertem Protein, die durch die zusätzliche Rekrutierung anionischer Lipide

entsteht. Da die Messungen nur mit Modellmembranen durchgeführt worden sind und die für das Entstehen von K-Ras4B-Nanoclustern mitverantwortlich gemachten Proteine, wie Galectin-3, nicht berücksichtigt worden sind, können keine Rückschlüsse über das Auftreten von Nanoclustern in vivo gezogen werden. Es ist möglich, dass die Dynamik der Nanocluster so schnell ist, dass sie durch die AFM-Messungen nicht aufgelöst werden kann. Weiterhin könnten Proteine, wie Galectin-3 oder Neucleophosmin die Nanocluster in vivo gegeneinander abschirmen und so die Fusion zu größeren Domänen verhindern. Die beobachteten Mikrodomänen könnten auch die Vorstufe von Nanoclustern darstellen, die sich erst für die Signaltransduktion bilden.

Interessant ist der Vergleich zu farnesyliertem N-Ras, das in biphasischen, ungeladenen Membransystemen besonders in der Grenzregion beider Phasen angereichert wird, da es offenbar keine ausgeprägte Präferenz für eine der beiden Phasen gibt. Interessanterweise verhält sich K-Ras4B wahrscheinlich aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Lipiden der Membran und dem positiv geladenen C-Terminus von K-Ras4B bedeutend anders. Der ungesättigte, verzweigte Farnesylrest verhindert eine Anreicherung in der I_o -Phase. Interessanterweise ist die Insertion in die mit 10% negativer Ladung angereicherte I_d -Phase energetisch auch nicht favorisiert. Somit kommt es wahrscheinlich durch einen Lipid-Sortierungsmechanismus zur Ausbildung einer neuen fluiden Domäne mit einem höheren Anteil negativ geladener Lipide und inkorporiertem Protein, die durch die zusätzliche Rekrutierung anionischer Lipide entsteht. Ob die Bildung einer neuen Domäne innerhalb der I_d -Phase spezifisch für farnesylierte, polybasische Proteine ist muss in weiteren Arbeiten durch entsprechenden Kontrollexperimente belegt werden.

4.5 Arbeiten zur Aufklärung des Protein Acylierungskreislaufes

Die S-Palmitoylierung ist eine reversible, posttranslationale Lipid-Modifikation, die bei unterschiedlichsten peripheren und integralen Membranproteinen auftritt. Diese spielen z.B. eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion, in synaptischen Funktion oder der Membranfusion.^[71, 79, 215] Die Palmitoylierung kann die laterale Verteilung in Mikrodomänen sowohl für periphere als auch für integrale Membranproteine beeinflussen.^[91] Sie reguliert weiterhin den anterograden oder endocytotischen Transport

von integralen Membranproteinen und führt meistens zur stabilen Membranverankerung von ehemals cytosolischen Proteinen.^[216] Dabei hat die Palmitoylierung durch ihre Reversibilität einen starken Einfluss auf die Regulation der Gleichgewichtslokalisierung sowie der Proteinfunktion.^[204, 217-218]

Trotz dieser wichtigen Funktion für die Regulierung zellulärer Prozesse sind die bestimmenden Parameter für die Palmitoylierung noch nicht eindeutig geklärt.

Es konnte gezeigt werden, dass zum Einen die Palmitoylierung an unterschiedlichen Membrankompartimenten^[83, 219-224] und zum Anderen die Depalmitoylierung an der Plasmamembran^[221, 223] stattfindet. Die Kinetik dieser Prozesse liegt im Bereich von Stunden^[225-227] bis hin zu Minuten^[223].

Vor kurzem wurden Proteinacyltransferasen in Hefe und im menschlichen Genom identifiziert.^[80-83] Sie gehören zur Klasse der DHHC Proteine, die aus 23 Mitgliedern besteht.^[84] Für einzelne Beispiele konnte eine Substratselektivität gezeigt werden,^[228-229] obwohl eine Erkennungssequenz für die Palmitoylierung noch nicht gefunden werden konnte.^[215, 230]

Die Acylproteinthioesterase (APT1) ist zurzeit das einzige Enzym, von dem bekannt ist, dass es *in vivo* Proteine depalmitoylieren kann.^[85-88]

Kürzlich konnten die strukturellen Parameter des Ras Acylierungskreislauf durch die Kombination von chemischer Synthese und „life-time imaging“ näher beleuchtet werden.^[174]

Durch den Einsatz semisynthetischer N-Ras-Proteine konnte gezeigt werden, dass die Palmitoylierung ausschließlich am Golgi-Apparat und innerhalb von Sekunden abläuft. Sie ist weder stereospezifisch, noch benötigt sie einen auf α -Aminosäuren basierenden C-Terminus. Weiterhin hat die 3-dimensionale Struktur des Ras-Proteins keinen Einfluss auf den Acylierungskreislauf. Diese Versuche stellen die Palmitoylierung als einen unspezifischen Eintritt in den Acylierungskreislauf dar. Demnach würde der Golgi-Apparat den generellen Palmitoylierungsort für periphere Membranproteine darstellen. Um diese generelle Funktion des Golgi-Apparates genauer aufzuklären, sollten zwei weitere Klassen von Proteinen genauer untersucht werden. N-myristoylierte und nicht-lipidierte, periphere Membranproteine, die entsprechend palmitoyliert werden können.

Der Acylierungskreislauf dieser peripheren Membranproteine sollte mit semisynthetischen Konstrukten untersucht werden. Diese Chimären bestehen aus einem Ras-Protein sowie N-myristoylierten bzw. nicht-lipidierten, Peptidsequenzen. Mit diesen palmitoylierbaren Proteinen kann man *in vivo* durch das Phänomen des „kinetic trappings“^[223, 231], ihren Palmitoylierungsort bestimmen.

Um den einen Einfluss der 3-dimensionalen Struktur des Ras-Proteins auszuschließen, sollte in weiteren Arbeiten das Ras-Protein durch ein artifizielles Protein ausgetauscht werden, das im zellulären Testsystem nicht vorkommt. Ein Beispiel dafür ist das grün fluoreszierende Protein (GFP).

Als myristoylierte oder nicht-lipidierte Peptide wurden die entsprechenden N-terminalen Sequenzen von G α i, Fyn, Yes und Gap43 ausgewählt. G α i und Gap43 wurden ausgewählt, da in vorangegangenen Studien von Dr. ROCKS gezeigt werden konnte, dass Proteinkonstrukte mit dem N-Terminus von an der Plasmamembran und am Golgi-Apparat lokalisieren und zwischen beiden Kompartimenten austauschen können.

Weiterhin wird Gap43 nur reversibel palmitoyliert und besitzt keinen stabilen Membrananker. Diese Membranverankerung wurde bisher sehr wenig untersucht, sodass es nur wenige Daten bezüglich des Acylierungskreislaufes von Gap43 gibt. In der Literatur wird die Frage diskutiert, ob Gap43 nur kurzzeitig mit der Palmitoylierungsmaschinerie durch schwache intrinsische Membranwechselwirkung in Kontakt kommt.^[232-233]

Interessanterweise belegen experimentelle Untersuchungen für die Kinase Fyn, dass sie an der Plasmamembran palmitoyliert wird.^[175] Die dabei verwendeten Methoden besitzen Zeitaufösungen von ca. 5 min. Sie geben daher, wahrscheinlich nur den Gleichgewichtszustand wieder und können keine verlässliche Aussage über den Palmitoylierungsort treffen.

4.5.1 Synthese N-myristoylierter und nicht-lipidierter Peptide

Es wurden Peptide und Proteine, die an entsprechenden Cysteinen reversibel palmitoyliert werden können, synthetisiert. Zusätzlich wurden Serinanaloga, bei denen diese Cysteine durch Serine ausgetauscht wurden, als Negativkontrolle hergestellt.

Die semisynthetischen Proteine wurden mittels der MIC-Ligations-Technik hergestellt. Dabei reagiert das Thiol eines Cystein mit einem Michael-Akzeptor unter Ausbildung einer kovalenten Bindung.

In diesem Fall wurde eine mit dem C-Terminus der Peptide verknüpfte Maleinimido-Funktion als Michael-Akzeptor verwendet. Das notwendige Cystein ist am C-Terminus des Proteins lokalisiert (Abbildung **40**).

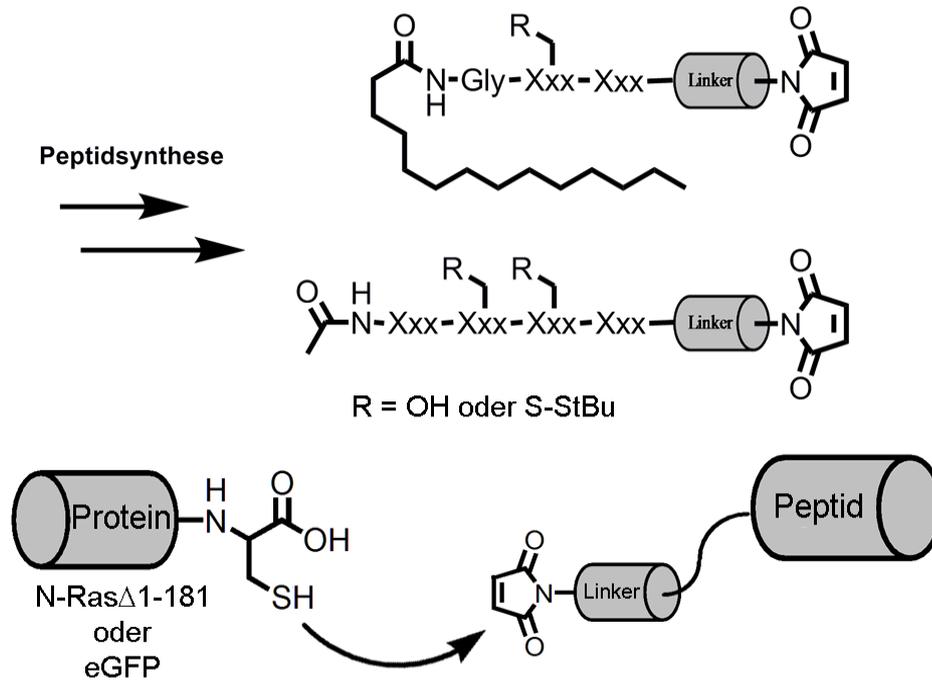


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Synthesestrategie für die benötigten semisynthetischen Proteine. N-myristoylierte oder nicht lipiderte Peptide werden mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Dabei werden sowohl Peptide deren Cysteine reversibel palmitoyliert werden können als auch Serinanaloga, bei denen diese Cysteine durch Serine ausgetauscht wurden, als Negativkontrolle hergestellt. Durch MIC-Ligation werden diese Peptide an Cy3-N-Ras Δ 1-181 oder eGFP ligiert

Nach der gewählten Strategie wird zuerst das N-myristoylierte Peptid an der festen Phase aufgebaut. Dann erfolgt nach Abspaltung von der festen Phase eine Funktionalisierung mit Maleinimidocapronsäure in Lösung.

Das notwendige N-myristoylierte Glycin **39** wurde als Building Block eingesetzt und durch Reaktion von Myristoylchlorid und Glycin in einem basischen Wasser/Diethylether-Gemisch hergestellt (Abbildung 41).

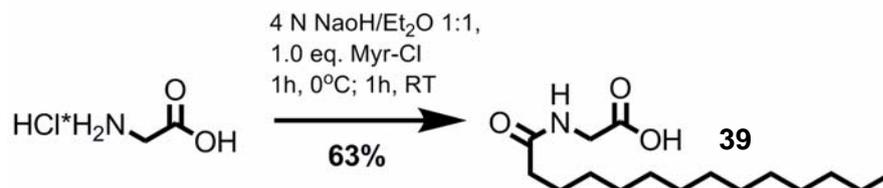


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Synthese des N-myristoylierten Glycins **39**.

Als Anker wurde das schon in Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 verwendete orthogonal geschützte Lysinderivat **1** benutzt, das über seine Seitenkette mit einem 2-Cl-Trityllinker an der festen Phase immobilisiert werden kann. Nach der Beladung des Harzes (siehe Kapitel 4.1.3) wurde das Peptid unter Verwendung von Fmoc als temporäre Schutzgruppe und HCTU als Kupplungsreagenz am polymeren Träger aufgebaut. Als Schutzgruppen für die Seitenkettenfunktionalitäten der eingesetzten Aminosäuren wurden O-*t*Bu und N-Boc gewählt, die im Säuren (TFA/DCM 1:1) entschützt werden können. Für Cysteine wurde die zu den verwendeten Schutzgruppen orthogonale, reduktiv spaltbare S-*t*Bu Gruppe verwendet. Sie sollte erst nach der Proteinligation für zelluläre Experimente abgespalten werden. Dementsprechend konnte das vollständig geschützte Peptid vom polymeren Träger mit DCM/TFA/TES 97:1:2 abgespalten werden. Maleinimidocapronsäure wurde dann direkt mit HATU und dem in DMF gelösten Peptid umgesetzt. Nach der Entschützung des funktionalisierten Peptides (TFA/DCM 1:1) wurde dieses mittels präparativer HPLC-Reinigung aufgearbeitet. Das myristoylierte Hexapeptid des N-Terminus von G α i **40** wurde mit einer Ausbeute von 7% und das entsprechende Serinanalogen **41**, in dem das palmitoylierbare Cysteine durch Serin ausgetauscht wurde, mit einer Ausbeute von 10% erhalten (Abbildung 42).

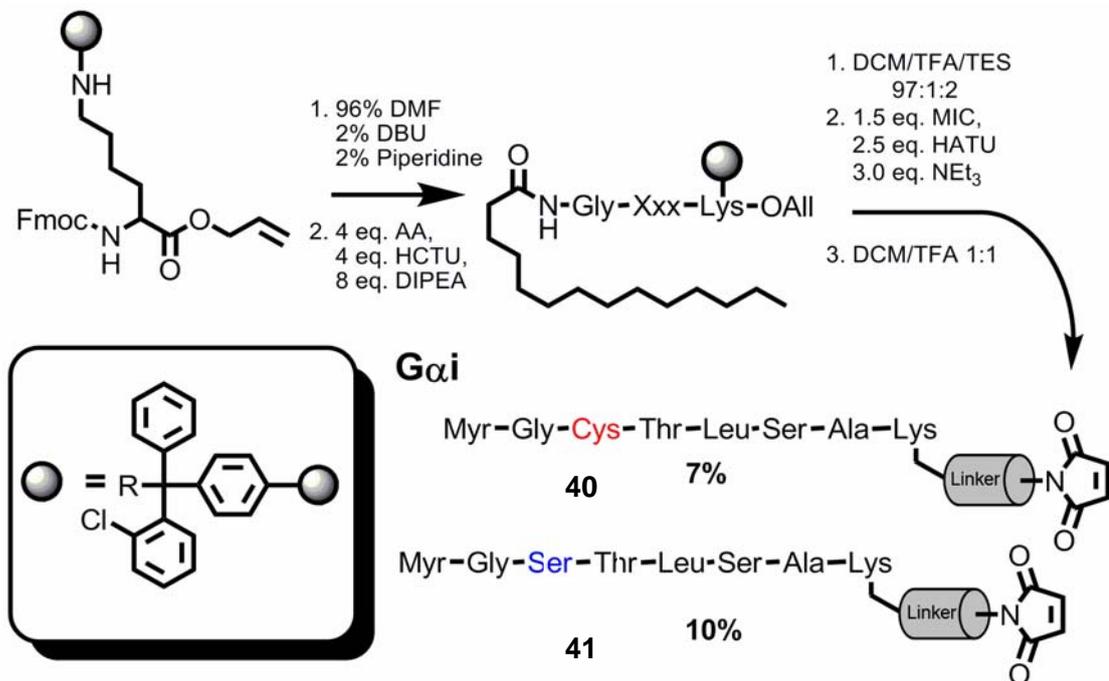


Abbildung 42: Schematische Darstellung der generellen Synthese von N-myristoylierten Peptiden, die in Lösung C-terminal mit Maleinimidocapronsäure modifiziert werden.

Die Synthesestrategie wurde weiterentwickelt, um die Maleinimidocapronsäure-modifizierten Peptide vollständig an der festen Phase aufbauen zu können. Somit entfielen die zeitaufwendigen Schritte der Beladung des polymeren Trägers, der Abspaltung und Analyse des Rohproduktes, der zusätzlichen Entschützung sowie der Maleinimidocapronsäure-Kupplung in Lösung.

In der modifizierten Strategie wurde die Verbindung zur festen Phase geändert. Sie basiert auf der Verknüpfung der Carbonsäure von Fmoc-Lys(Mmt) mit Rink-Amid-Harz. Nach dem Aufbau des Peptids an der festen Phase wurde die Mmt-Schutzgruppe von der Lysinseitenkette mit DCM/HFIP/TFE/TES (6.5:2:1:0.5) abgespalten. Diese Bedingungen sind zu den anderen verwendeten Schutzgruppen (siehe oben) orthogonal. Maleinimidocapronsäure konnte dann an das entschützte Amin gekuppelt werden. Danach wurde das Peptid vom polymeren Träger mit TFA/H₂O/TES (97:2.5:2.5) bei gleichzeitigem Entfernen der verbliebenen Schutzgruppen abgespalten (Abbildung 43). Nach präparativer HPLC wurden die Peptide in Ausbeuten zwischen 3% und 15% erhalten (Abbildung 44).

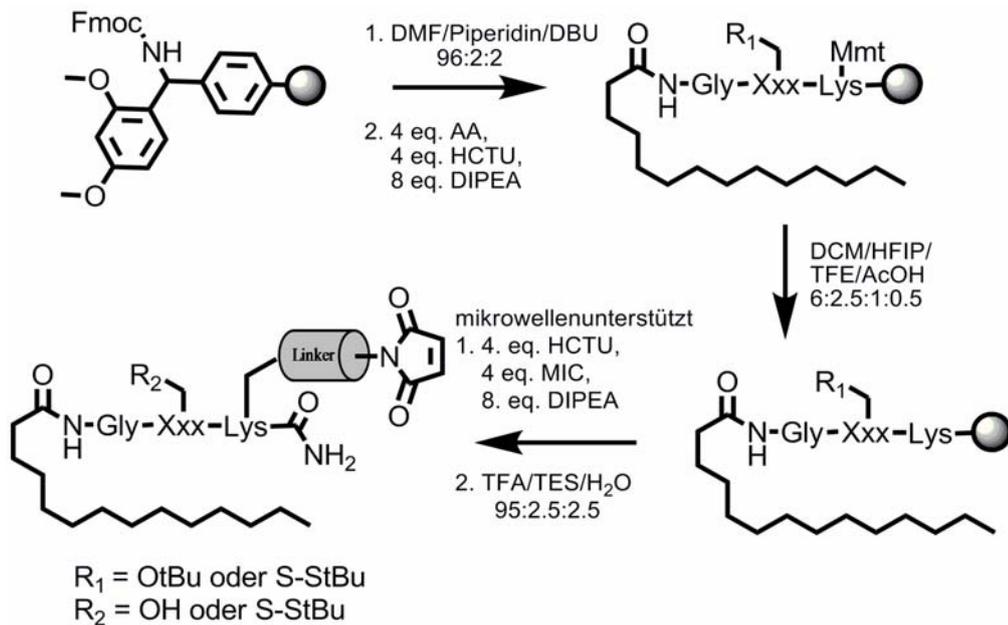
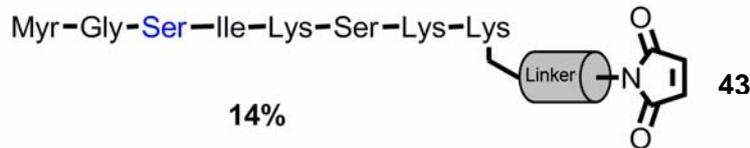
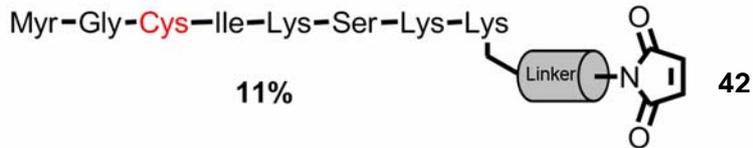


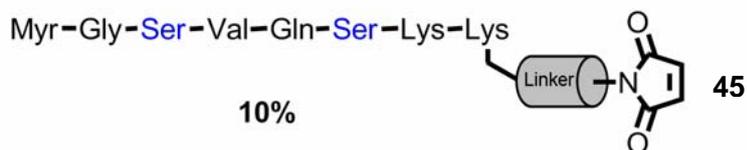
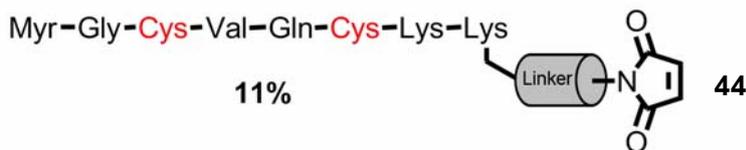
Abbildung 43: Schema der Festphasensynthese C-terminal Maleinimidocapronsäure modifizierter Peptide, die vollständig am polymeren Träger aufgebaut werden. Neben den palmitoylierbaren Peptiden wurden auch die entsprechenden Negativkontrollen für die weiteren zellulären Experimente synthetisiert. In diesen Peptiden sind die palmitoylierbaren Cysteine durch Serine ausgetauscht.

Beide Strategien führten zu zufriedenstellenden Ausbeuten für die mit Maleinimidocaprinsäure modifizierten Peptide. Die geringe, dreiprozentige Ausbeute für Gap43 lässt sich auf ein technisches Problem während der präparativen HPLC zurückführen. Der vollständige Aufbau der Peptide an der festen Phase war hinsichtlich der Zeiteffizienz einer Funktionalisierung in Lösung überlegen.

Yes



Fyn



Gap43

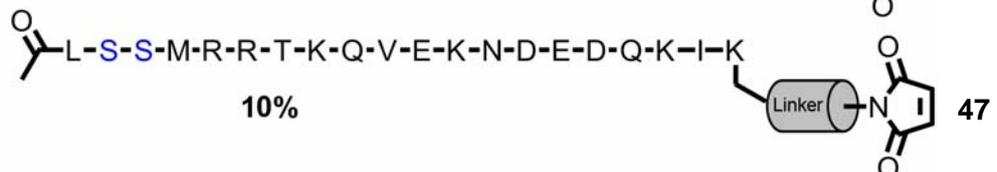
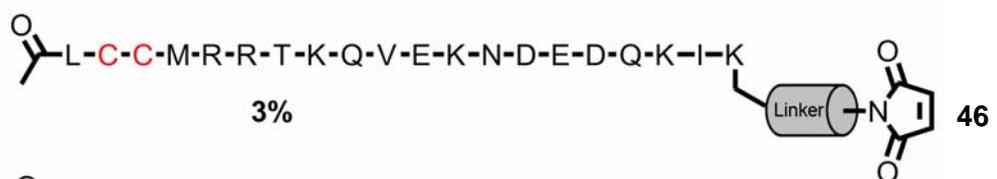


Abbildung 44: Schematische Darstellung der nach Abbildung 41 synthetisierten MIC-modifizierten Peptide. Neben den palmitoylierbaren Peptiden wurden zusätzlich die entsprechenden Negativkontrollen für die weiteren zellulären Experimente synthetisiert. In diesen Peptiden sind die palmitoylierbaren Cysteine (rot) durch Serine (blau) ausgetauscht.

4.5.2 Semisynthetische Proteine durch MIC-Ligation

Die Darstellung der entsprechenden N-Ras-Fusionsproteine wurde mittels der etablierten MIC-Ligation durchgeführt.^[172] Dabei reagiert das Thiol eines Cysteins, das am C-Terminus von Cy3-modifiziertem N-Ras lokalisiert ist, mit den Maleinimidocaprinsäure modifizierten Peptiden aus Kapitel 4.5.1 und bildet eine kovalente Thioether-Bindung aus. Für die Ligation werden 2 Äq. des Maleinimidocaprinsäure modifizierten Peptids mit Cy3-modifiziertem N-Ras Δ 1-181 in Ligationspuffer umgesetzt und für 16h Stunden inkubiert. Das eingesetzte N-Ras Δ 1-181 wurde in einer vorangestellten Reaktion mit Cy3-NHS statistisch an einer Lysinseitenkette modifiziert. Bei dieser Reaktion werden ca. 20% der N-Ras Δ 1-181 Proteine mit Cy3 modifiziert.

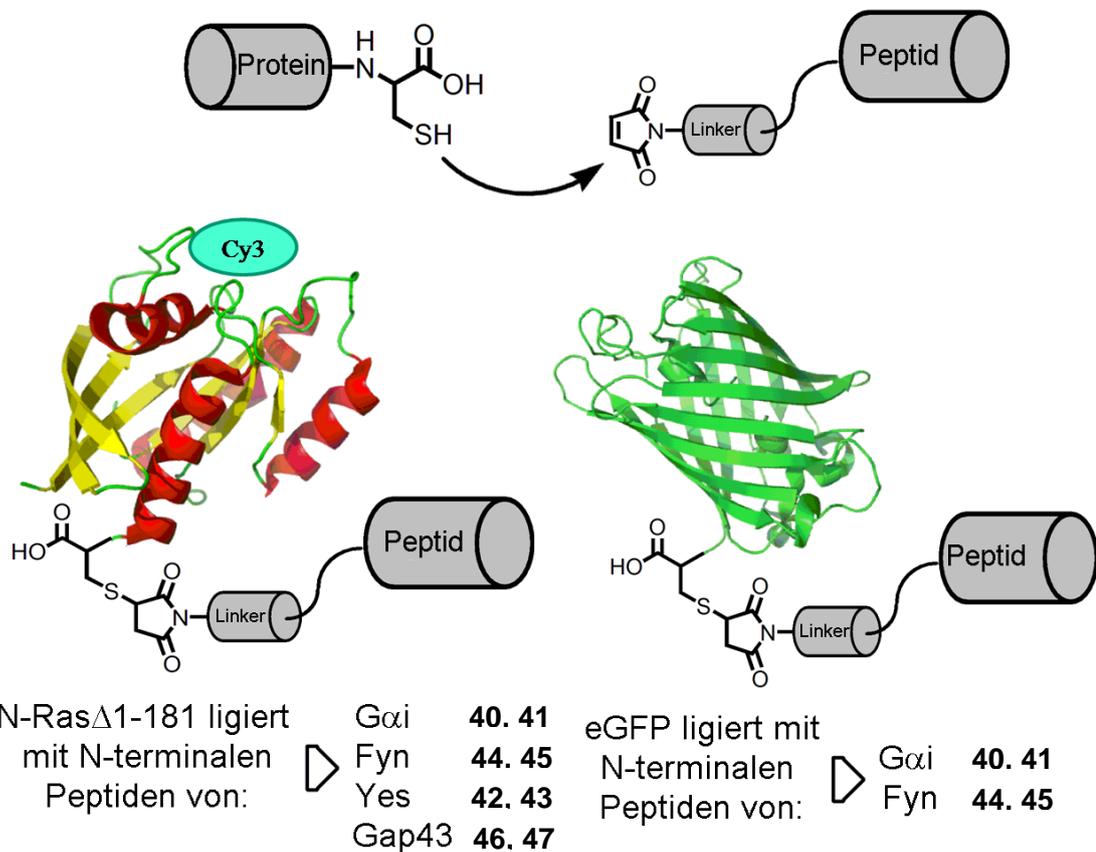


Abbildung 45: Schema der Synthese C-terminal modifizierter N-Ras und GFP Proteine mittels der MIC-Ligation. **Oben:** Schematische Darstellung der MIC-Ligation bei der ein MIC-modifiziertes Peptid mit dem C-terminalen Cystein eines Proteins in einer Michael-Addition reagiert. **Links:** N-Ras Δ 1-181 das mit den Maleinimidocaprinsäure-modifizierten Peptiden von G α i (40, 41), Fyn (44, 45), Yes (42, 43) und Gap43 (46, 47) ligiert wurde. **Rechts:** GFP, das mit den Maleinimidocaprinsäure-modifizierten Peptiden von Gai (40, 41) und Fyn (44, 45) ligiert wurde.

Das Reaktionsgemisch kann nach Dialyse, durch die das nicht ligierte Peptid entfernt wurde, mittels Tritonextraktion aufgearbeitet werden. Das ligierte N-Ras Fusionsprotein kann dabei aufgrund des eingeführten Myristoylrestes in die Triton-phase extrahiert werden, während das nicht ligierte N-Ras Δ 1-181 in der wässrigen Phase bleibt. Durch diese effiziente Aufarbeitung konnten die unterschiedlichen N-myristoylierten, Cy3-modifizierten Ras-Chimären mit Ausbeuten von 20-30% erhalten werden (Abbildung 45 und Tabelle 2).

Für die Ligation verwendetes Protein	Ligiertes Peptid	Ausbeute
N-RasΔ1-181	G α i (40)	22%
	G α i* (41)	24%
	Fyn (44)	20%
	Fyn* (45)	25%
	Yes (42)	26%
	Yes* (43)	30%
	Gap43 (46)	4%
	Gap43* (47)	5%
eGFP	G α i (40)	23%
	G α i* (41)	21%
	Fyn (44)	26%
	Fyn (45)	27%

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ausbeuten der MIC-Ligation von N-Ras Δ 1-181 und eGFP mit unterschiedlichen N-terminalen Peptiden. *Die Cysteine dieser Sequenz wurden durch Serine ausgetauscht.

Für das Reaktionsgemisch aus nicht lipidierten Peptiden und N-Ras Δ 1-181 konnte diese Strategie nicht verwendet werden, weil sich die Lipophilie des Proteins vor und nach der Reaktion nicht bedeutend unterscheidet. Auch die nur geringe Änderung des pI des Proteins nach der Ligation ist nicht ausreichend, um eine effiziente Aufarbeitung des Reaktionsgemisches durch Ionen-Austauschchromatographie zu ermöglichen. Ferner ändert sich das Molekulargewicht des Proteins durch die Ligation nicht bedeutend, so dass eine Größenausschlusschromatographie nicht möglich war und eine neue Strategie für die Aufarbeitung entwickelt werden musste.

Nicht ligiertes N-Ras Δ 1-181, das im Reaktionsgemisch vorliegt, besitzt im Gegensatz zum ligierten Fusionsprotein ein freies Cystein am C-Terminus. Anhand dieses

Cysteins kann das Reaktionsgemisch aufgearbeitet werden, indem es mit aktivierter Thiol-Sepharose4B Säulenmaterial inkubiert wird. Die Oberfläche des Säulenmaterials besteht aus gemischten Disulfiden, die durch das entsprechende Cystein am nicht-ligierten N-Ras Δ 1-181 gespalten werden können. Das nicht umgesetzte Protein wird daher am Säulenmaterial immobilisiert und aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Nach einer Dialyse zur Entfernung des nicht reagierten Peptids wurde die Reaktionslösung mit Thiol-Sepharose inkubiert und der Überstand, der nur das Fusionsprotein enthält, aufkonzentriert. Durch diese neue Aufarbeitung lagen die Ausbeuten für das Fusionsprotein von Cy3-modifiziertem N-Ras Δ 1-181, dem N-Terminus von Gap43 sowie dem entsprechenden Serinanalogen bei 4-6% (Tabelle 2). Um Effekte durch N-Ras Δ 1-181 auszuschließen, sollten einige der MIC-modifizierten Peptide mit GFP ligiert werden. Dadurch ist es möglich, den Einfluss des C-Terminus auf die Lokalisation des Proteins vollständig unabhängig von der dreidimensionalen Struktur des Protein zu untersuchen, da GFP im benutzten zellulären System nicht vorkommt. Ein Nebeneffekt ist darüber hinaus, dass man Fusionsproteine erhält, die zu 100% fluoreszenzmarkiert sind.

Versuche, ein natürliches Cystein des GFPs, für die MIC-Ligation zu verwenden, schlugen fehl. Daher wurde ein zusätzliches C-terminales Cystein von Dipl. Biochemiker B. ELLINGER in die GFP-Sequenz kloniert. Diese GFP-Mutante konnte dann mit myristoylierten, MIC-modifizierten Peptiden des N-Terminus von *Gai* und *Fyn* sowie den entsprechenden Serinanaloga umgesetzt werden. Die unterschiedlichen Fusionsproteine wurden dabei in Ausbeuten von 21-27% erhalten. Alle Fusionsproteine mit entsprechend geschützten Cysteinen in der ligierten Peptidsequenz wurden nach der Aufarbeitung mit TCEP umgesetzt, um die StBu-Schutzgruppe abzuspalten und das Thiol für die Palmitoylierung nach der Mikroinjektion in Zellen zugänglich zu machen. Die MIC-Ligationen wurden von C. NOVAK durchgeführt.

4.5.3 „Life-time imaging“ unterschiedlicher Fusionsproteine zur Aufklärung des Proteinacylierungskreislaufs

Die hier beschriebenen Experimente wurden von Dr. O. ROCKS durchgeführt. Die synthetisierten Cy3-modifizierten N-Ras- und GFP-Fusionsproteine wurden in MDCK-Zellen mikroinjiziert. Nach der Mikroinjektion der einzelnen Sonden wurde die Palmitoylierung räumlich und zeitlich durch das Phänomen des „kinetic trappings“^[231]

aufgelöst, das eine Akkumulation der Proteine am Palmitoylierungsort durch die Reduzierung der effektiven Diffusion bewirkt (Abbildung 46).

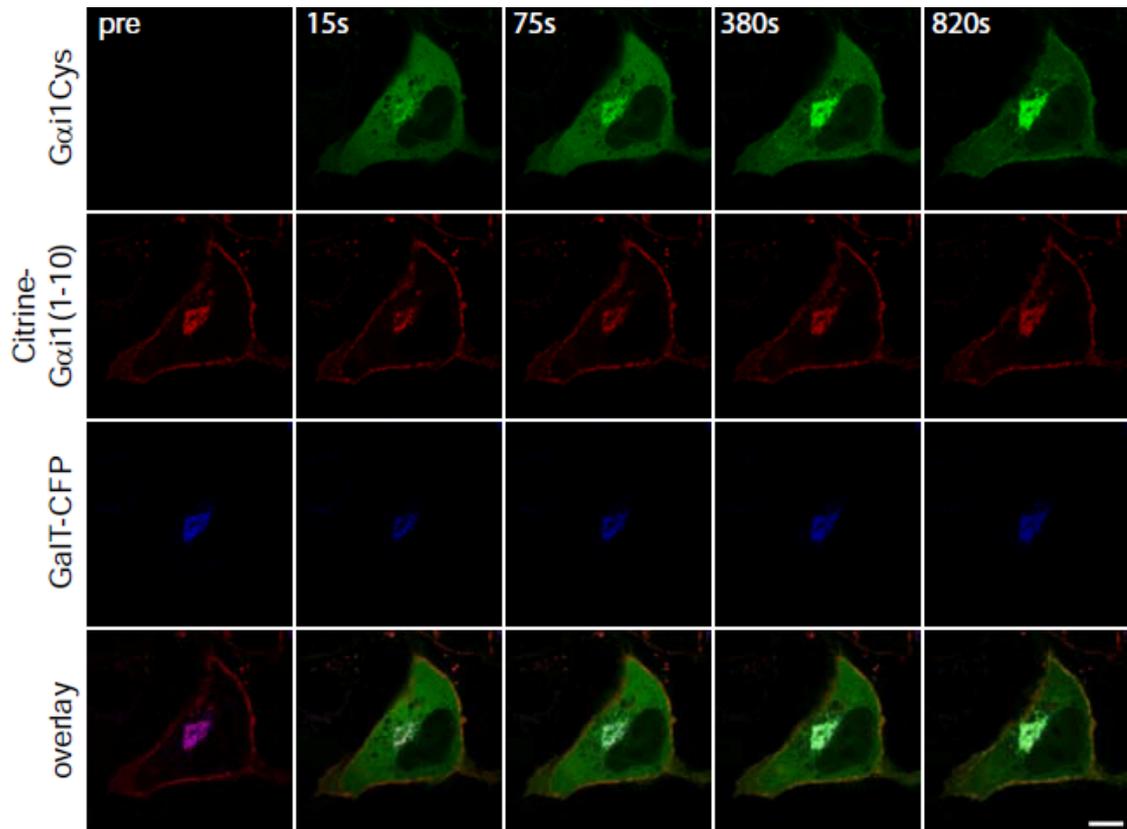


Abbildung 46: Beobachtung des Verhaltens von Cy3-N-Ras-G α i in MDCK-Zellen. Nach der Mikroinjektion wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch konfokale Mikroskopie das Membranverhalten von Cy3-N-Ras-G α i beobachtet. Als Golgi-Marker wird exprimiertes GalT-GFP verwendet. Als interne Referenz, um den Gleichgewichtszustand für G α i darzustellen, wird exprimiertes Citrin-Gai(1-10) verwendet. Cy3-N-Ras-G α i akkumuliert zuerst am Golgi-Apparat und zu späteren Zeitpunkten auch an der Plasmamembran.

Das semisynthetische Fusionsprotein aus Cy3-modifizierten N-Ras Δ 1-181 und dem N-myristoylierten Heptapeptid des N-Terminus von G α i lokalisiert nach der Mikroinjektion am Golgi-Apparat mit einer zu N-Ras vergleichbaren Kinetik ($t/2 = 20 \pm 11$ s; N = 6) (Abbildung 46 und 47 A).

Erst zu einem späteren Zeitpunkt wird es an der Plasmamembran angereichert. Der Austausch des palmitoylierbaren Cysteins durch ein Serin blockiert die Palmitoylierung und verhindert die Akkumulation am Golgi-Apparat. Das Serinanalogon ist folglich über die beobachtete Zeit im Cytosol sowie über alle Membranen gleichmäßig verteilt (Abbildung 47 C).

Das Fusionsprotein aus GFP und dem entsprechenden $G\alpha i$ -Heptapeptid zeigt dieselbe Kinetik der Palmitoylierung ($t/2 = 18 \pm 5$ s; $N = 5$) am Golgi-Apparat und dasselbe Verhalten nach Austausch des palmitoylierbaren Cysteins.

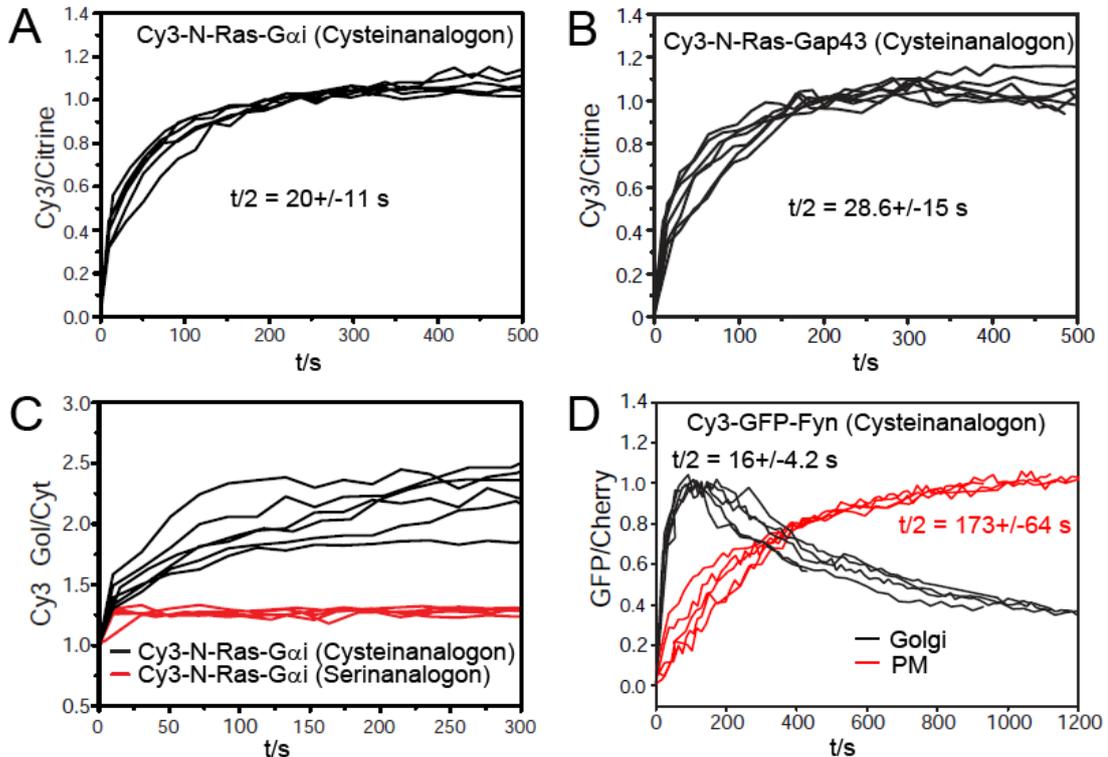


Abbildung 47: Kinetische Analyse der Palmitoylierung am Golgi-Apparat von semi-synthetischen N-Ras-Proteinen basierend auf dem N-Terminus von $G\alpha i$ und Gap43 und vom Fusionsprotein GFP-Fyn. Dafür werden die Fluoreszenzintensitäten der mikroinjizierten semisynthetischen N-Ras oder GFP Proteine gemessen. Entsprechende endogene Fusionsproteine (Cytrine- $G\alpha i(1-10)$ für Cy3-N-Ras- $G\alpha i$, Cytrine-N-Ras für Cy3-N-Ras-Gap43 und Cherry- $G\alpha i(1-10)$ für GFP-Fyn), die den Gleichgewichtszustand widerspiegeln, werden als interne Referenz verwendet. Das Erreichen des Gleichgewichtszustandes am Golgi-Apparat wird für die Auswertung auf 1 normalisiert. **A** Quantitative Analyse der Akkumulierung von Cy3-N-Ras- $G\alpha i$ am Golgi-Apparat ($N = 6$). **B** Quantitative Analyse der Akkumulierung von Cy3-N-Ras-Gap43 am Golgi-Apparat ($N = 7$). **C** Vergleich der Verteilung von Cy3-N-Ras- $G\alpha i$ (Cystein- ($N = 6$) und Serinanalogon ($N = 4$)) zwischen Golgi-Apparat (Gol) und Cytosol (Cyt) über die Zeit. **D** Quantitative Analyse der Akkumulierung von GFP-Fyn am Golgi-Apparat ($N = 5$) und an der Plasmamembran ($N = 5$).

Für das semisynthetische Fusionsprotein von Fyn und GFP konnte auch eine spezifische Akkumulierung am Golgi-Apparat ($t/2 = 16 \pm 4.2$ s; $N = 5$) nach der Mikroinjektion festgestellt werden. Interessanterweise besitzt diese auf dem N-Terminus von Fyn basierende Probe im Gleichgewichtszustand eine bedeutend höhere Anreicherung an der Plasmamembran ($t/2 = 173 \pm 64$ s; $N = 5$) als dies für die übrigen beobachteten Proteine der Fall ist (Abbildung **47 D**).

Ähnliche Beobachtungen wurden für die Fusionsproteine aus dem N-terminalen Nonadecapeptid von Gap43 und Cy3-modifizierten N-Ras Δ 1-181 gemacht. Das Protein akkumuliert spezifisch am Golgi-Apparat ($t/2 = 29 \pm 15$ s; $N = 7$) (Abbildung **47 B**). Ein Austausch beider palmitoylierbarer Cysteine durch Serine unterbindet die spezifische Assoziation mit dem Golgi-Apparat. Das Protein ist dann gleichmäßig über alle Membranen und im Cytosol verteilt. Die fehlende Palmitoylierung ermöglicht sogar ein Diffundieren des Proteins in den Zellkern. Die Fusionsproteine aus Cy3-modifiziertem N-Ras Δ 1-181 und den N-terminalen Heptapeptiden von Yes, Fyn wurden bis jetzt noch nicht mikroinjiziert.

4.5.4 Diskussion

Sowohl N-Ras Proteine als auch die in dieser Arbeit untersuchten semisynthetischen Proteine werden mit einer ähnlichen Kinetik palmitoyliert. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass weder ein spezielles Lipidierungsmuster noch ein stabiler Membrananker für die Palmitoylierung am Golgi-Apparat notwendig sind. Auch die dreidimensionale Struktur des Ras-Proteins ist für die Palmitoylierung nicht ausschlaggebend, da die GFP-Fusionsproteine basierend auf dem N-Terminus von Fyn und G α i auch am Golgi-Apparat palmitoyliert werden. Folglich konnte gezeigt werden, dass Fyn nicht an der Plasmamembran palmitoyliert wird. Die stärkere Anreicherung von GFP-Fyn an der Plasmamembran im Gleichgewichtszustand, die wahrscheinlich in früheren Untersuchungen zur fälschlichen Annahme geführt haben, dass Fyn an der Plasmamembran palmitoyliert wird, lässt sich durch die doppelte Palmitoylierung erklären. Fyn muss zweimal depalmitoyliert werden um seine stabile Verankerung an der Plasmamembran zu verlieren. Dies führt zu einer verstärkten Akkumulierung an der Plasmamembran.

Zusammen mit den Ergebnissen der Ras-Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass die drei Klassen peripherer Membranproteine - in Bezug auf ihre Membrananker (farnesyliert, palmitoyliert - N-myristoyliert, palmitoyliert - nur palmitoyliert) nicht lipidiert) - bevorzugt an der Oberfläche des Golgi-Apparates palmitoyliert werden. In

Zusammenhang mit der sekretorischen Funktion des Golgi-Apparates ermöglicht dies einen gerichteten Kreislauf. In diesem werden periphere Membranproteine am Golgi-Apparat palmitoyliert, dadurch stabil in der Membran verankert und über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran transportiert. Nach der Depalmitoylierung, die prinzipiell an allen Membrankompartimenten stattfindet, verlieren die Proteine ihre spezifische Lokalisierung und verteilen sich über alle Endomembranen. Durch die Palmitoylierung am Golgi-Apparat werden sie wieder eingefangen und dem Kreislauf zugeführt.

5. Zusammenfassung

5.1 *Semisynthetische K-Ras4B Proteine*

In dieser Arbeit wurde eine effiziente Strategie zur Synthese posttranslational modifizierter K-Ras4B und H-Ras-Proteine durch eine Kombination aus molekularbiologischen Techniken und organischer Synthese entwickelt. Mittels Festphasenpeptidsynthese wurde das C-terminale Undecapeptid von K-Ras4B mit seinen posttranslationalen Modifikationen einschließlich der polybasischen Sequenz synthetisiert. Ein entsprechend verkürztes K-Ras4B Δ 1-174 Protein wurde mittels der Intein-Technologie als C-terminaler Thioester exprimiert. In einer Ligationreaktion reagiert das am N-Terminus des Undecapeptid eingeführte Cystein mit dem Proteinthioester und führt unter Ausbildung einer Amidbindung zu posttranslational modifiziertem K-Ras4B in Ausbeuten von 75% (Abbildung 46).

In PC12-Zellen konnte mittels eines phänotypischen Assays die biologische Aktivität des semisynthetischen K-Ras4B **15** nachgewiesen werden. Semisynthetisches K-Ras4B **15** besitzt demzufolge nach der Ligation sowie unterschiedlichen Aufarbeitungsschritten noch seine native 3-dimensionale Struktur. Weiterhin konnte ein Einfluss des für die Ligation eingeführten zusätzlichen Cysteins auf die biologische Aktivität ausgeschlossen werden.

Basierend auf dieser Strategie, die es erlaubt, unterschiedliche Modifikationen in den C-Terminus von K-Ras4B einzuführen, wurden folgende Analoga synthetisiert: Ein phosphorylierte K-Ras4B **17**, ein K-Ras4B **16**, das anstatt des Serin 181 eine Glutaminsäure besitzt und ein K-Ras4B ohne Carboxymethylierung **19** (Abbildung 48). Weiterhin konnte farnesyliertes, carboxymethyliertes H-Ras **25** durch die Ligation des C-terminalen Tripeptids und des entsprechend verkürzten, H-Ras Δ 1-183-Mesna Thioester hergestellt werden. Für diese Ligation konnte ein natürlich vorkommendes Cystein benutzt werden.

Um den Mechanismus mit dem K-Ras4B vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran gelangt besser zu verstehen wurde mittels Oberflächenplasmonenresonanz das Dissoziationsverhalten dieser K-Ras4B-Analoga aus ungeladenen und unterschiedlich negativ geladenen Membranen quantitativ untersucht (Abbildung 49). Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss negativer Ladung (Phosphat-Rest, Carbonsäure) im C-Terminus von K-Ras4B auf das Membranverhalten gelegt.

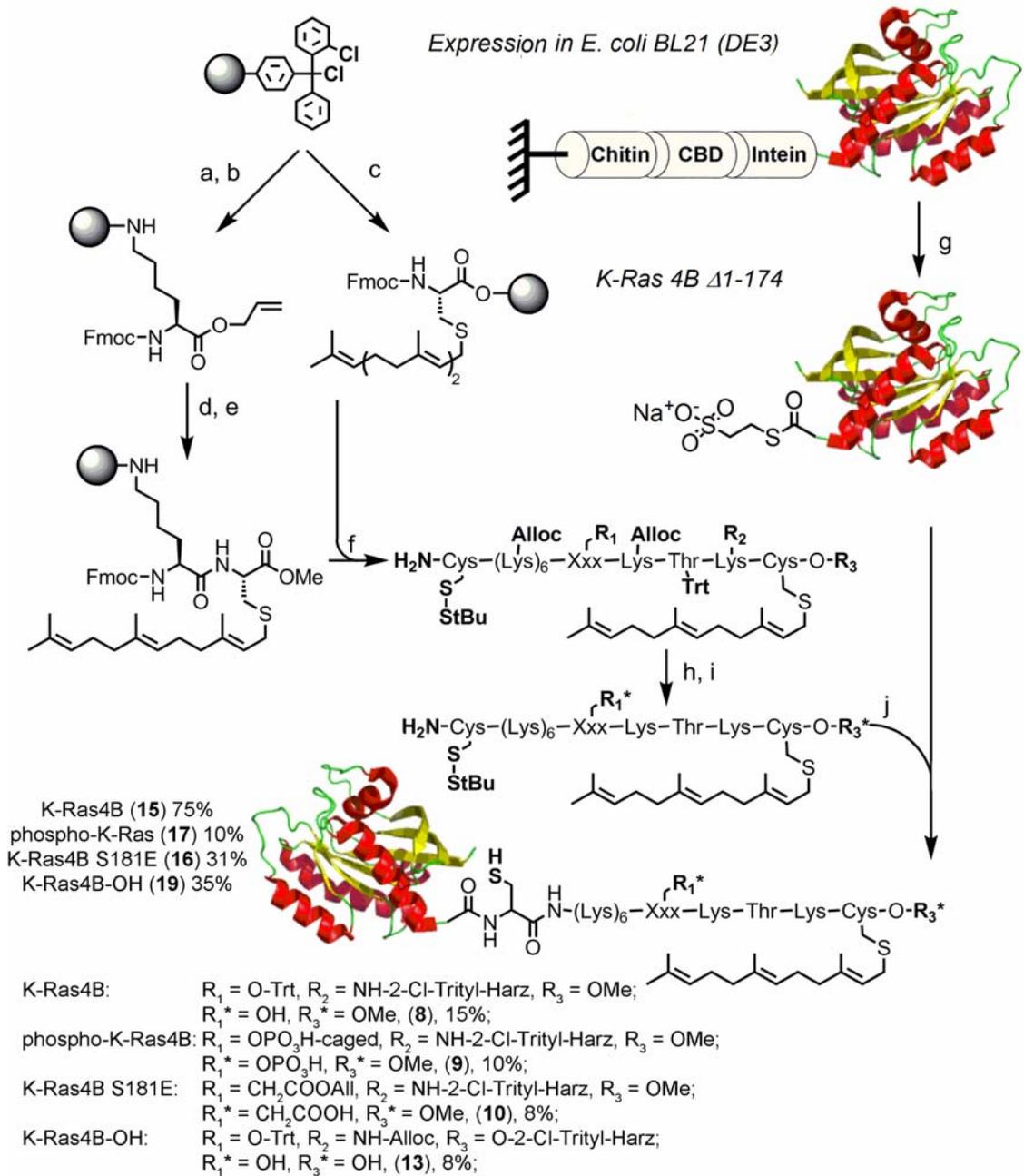


Abbildung 48: Schema für die generelle Synthese von posttranslational modifizierter K-Ras4B Proteinen. **a)** Fmoc-Lys(Boc)-OAll 1, TFA/DCM (1:1) **b)** DIPEA, DCM **c)** Fmoc-Cys(Far) 3, DIPEA, DCM **d)** Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, THF, Ar **e)** Cys(Far)-OMe 2, PyBOP, DMF/NMM (96:4) **f)** Festphasenpeptidsynthese: **i.** Fmoc-As, HCTU, DIPEA, DMF **ii.** DMF/Piperidin/DBU (96:2:2) **g)** 20 mM Hepes, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 50 mM Mesna, pH 8.5 **h)** Pd(PPh₃)₄, Piperidin/DMF (4:1), Ar **i)** DCM/TFA/Et₃SiH (97:1:2) **j)** **i.** 250 μM K-Ras Peptid, 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MESNA, 5mM TCEP, pH 8.5, Ar **ii.** 62.5 μM K-Ras4B Proteinthioester.

Es zeigte sich, dass die Dissoziationsgeschwindigkeit von K-Ras4B **15** aus künstlichen Membranen mit zunehmendem Anteil negativer Ladung in der Membran langsamer wird. Dies ist aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Lipiden in der Membran und der positiv geladenen polybasischen Sequenz zu erklären.

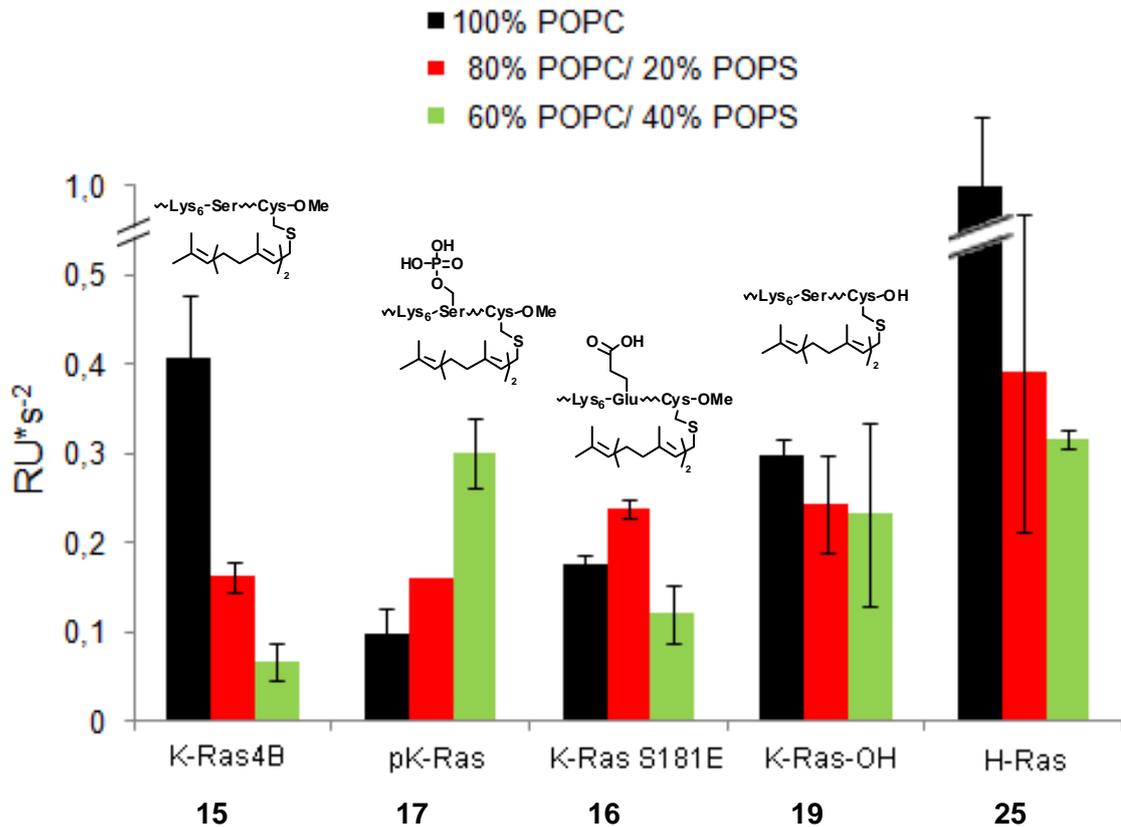


Abbildung 49: Schematische Darstellung der Dissoziationskonstanten von H-Ras, K-Ras4B und Analoga zu neutralen und negative geladenen Membranen. Die Dissoziationskonstante von K-Ras4B sinkt mit zunehmender negativer Ladung in der Membran im Gegensatz zum phosphorylierten Analogon. Die weiteren Analoga und H-Ras zeigen keinen interpretierbaren Trend.

Für phosphoryliertes K-Ras4B **17** zeichnet sich ein gegenläufiger Trend ab. Es assoziiert stabil mit ungeladenen Membranen. Je mehr negative Ladung in die Membran eingebracht wird, desto schneller ist die Dissoziation und dementsprechend schwächer die Bindung. Diese biophysikalischen Daten unterstützen die *in vivo* Beobachtungen über die veränderte Membranverteilung von phosphoryliertem K-Ras4B. Tauscht man das phosphorylierte Serin durch eine Glutaminsäure aus, dies wird häufig in molekularbiologischen Untersuchungen gemacht, so zeigen die Dissoziationskonstanten keinen eindeutigen Trend. Besonders für Untersuchungen

des Membranverhaltens ist von einem solchen Austausch abzuraten. K-Ras4B **19** ohne Carboxymethylierung weist zu keinem Membransystem eine stabile Membranbindung auf, das unterstreicht die Bedeutung der Carboxymethylierung für die Membranbindung. Semisynthetisches farnesyliertes H-Ras besitzt ebenso zu keinem Membransystem eine stabile Bindung. Diese erhält es erst durch weitere Palmitoylierungen.

Der in der Literatur diskutierte Transport von K-Ras4B vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran mittels elektrostatischer Diffusion lässt sich mit den beobachteten kinetischen Daten nicht erklären. Die annähernd lineare Abhängigkeit der Dissoziation in Bezug auf den Anteil negativer Ladung in der Membran kann die ausschließliche Lokalisierung von K-Ras4B an der Plasmamembran nicht erklären. Vielmehr spricht dies für einen gerichteten Transport durch ein Shuttle-Protein. Ein solches Shuttle-Protein könnte die δ -Untereinheit der Phosphodiesterase 6 (PDE δ) sein. In Oberflächenplasmonenresonanz-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PDE δ sowohl K-Ras4B **15** als H-Ras **25** aus künstlichen Membranen solubilisieren kann. Dabei besitzt PDE δ eine Präferenz für K-Ras4B **15**.

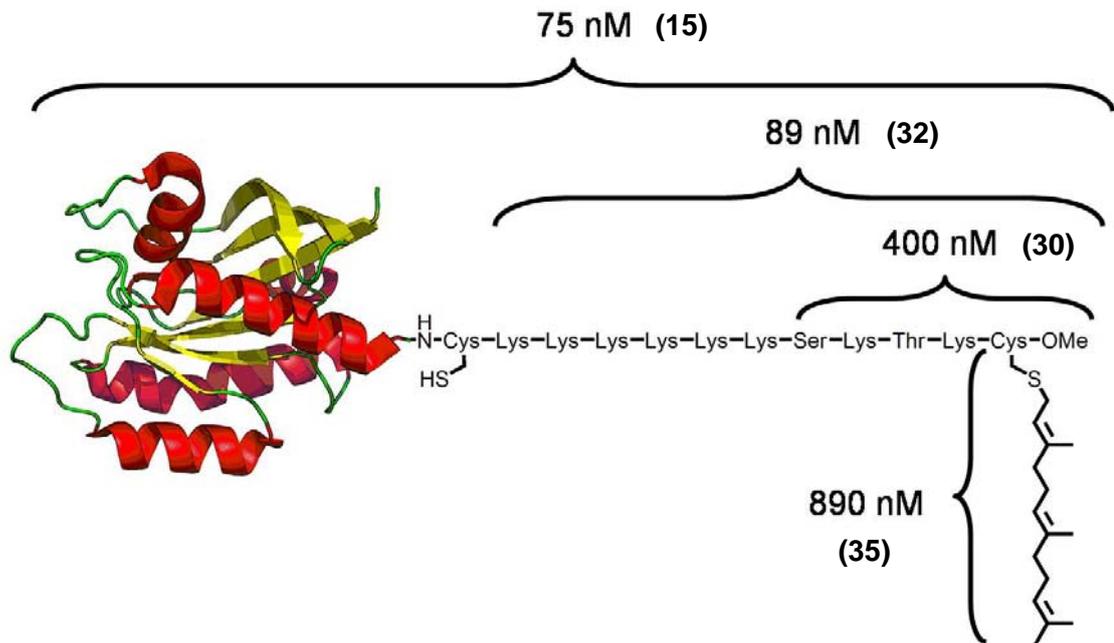


Abbildung 50: Schematische Darstellung der Affinität (K_D) von PDE δ -GST gegenüber K-Ras4B mit Blick auf die C-terminale Region. PDE δ -GST erkennt K-Ras4B über dessen C-Terminus, ohne maßgebliche Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Proteinkorpus von K-Ras4B einzugehen.

Mit Fluoreszenzpolarisationsmessungen konnte gezeigt werden, dass PDE δ den C-Terminus von K-Ras4B in nanomolaren Konzentrationen bindet und keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen PDE δ und der globulären Proteindomäne von K-Ras4B zu dieser Wechselwirkung beitragen (Abbildung 50). Andere farnesylierte Proteine, wie z.B. N-Ras bindet PDE δ nur mit mikromolaren K_D -Werten. Dies entspricht dem K_D -Wert mit dem PDE δ einen farnesylierten Cysteinmethylester bindet. Es konnte somit gezeigt werden, das PDE δ mögliches Shuttle-Protein in Frage kommt, um einen gerichteten Transport von K-Ras4B an die Plasmamembran zu gewährleisten.

Weiterhin konnte in Rasterkraftmikroskopie-Untersuchungen das Aggregationsverhalten von K-Ras4B in einer negativ geladenen Doppelschichtmembran bestehend aus isolierten Inseln einer fluiden „liquid disordered“-Phase (l_d), in die eine „raft-like liquid ordered“ Phase (l_o) eingebettet ist, untersucht werden. K-Ras4B **15** induziert in der l_d -Phase die Bildung einer neuen fluiden Domäne wahrscheinlich durch die elektrostatische Rekrutierung negativ geladener Lipide in die neue Domäne. Einen Hinweis auf die Bildung von in der Literatur beschriebenen Nanoclustern konnte nicht gefunden werden.

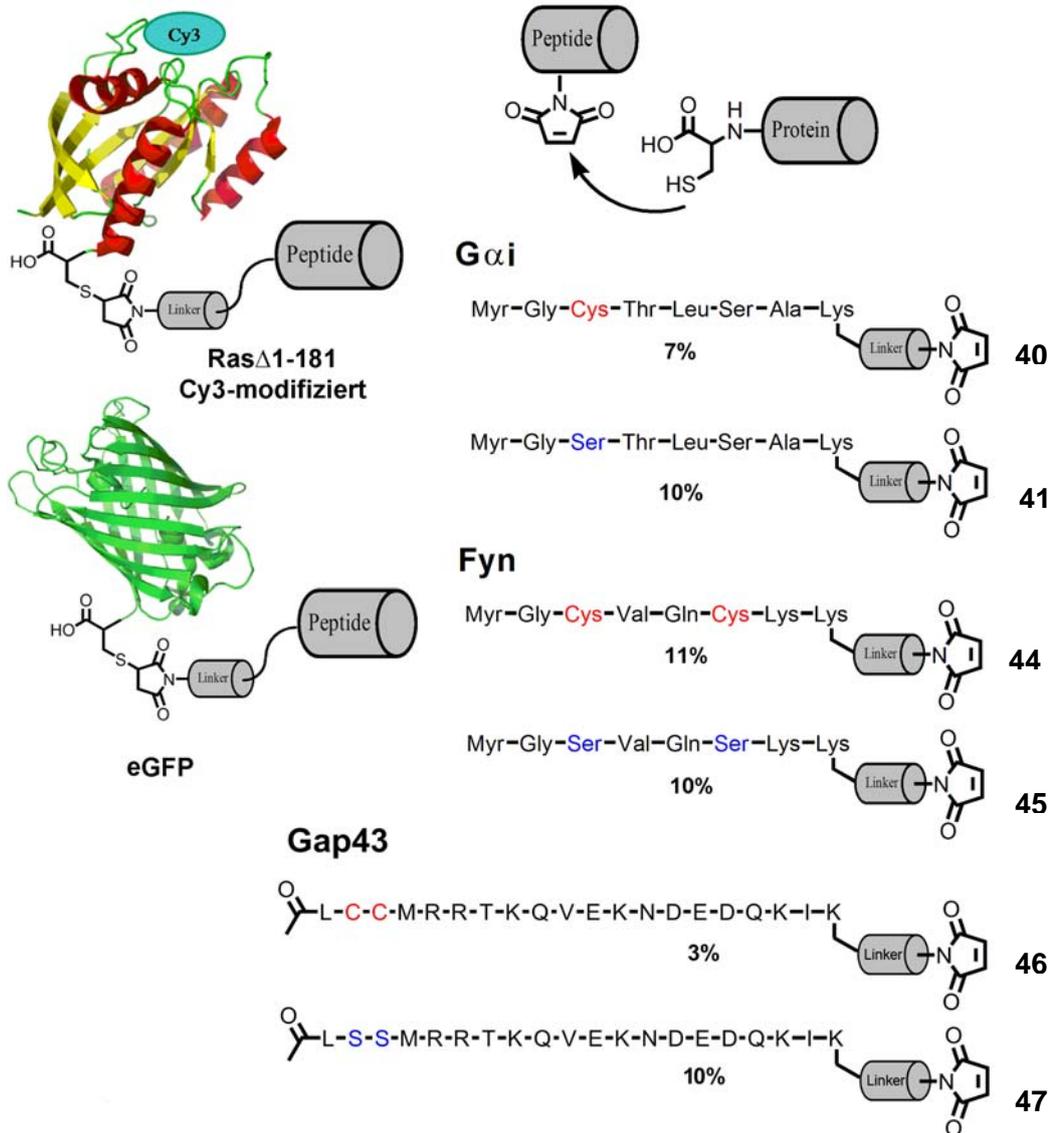
5.2 Der Acylierungskreislauf

In dieser Arbeit wurden, durch die Herstellung semisynthetischer Proteine, Sonden für die Aufklärung des Proteinacylierungskreislaufes entwickelt.

Aufgrund der fehlenden Spezifität der Palmitoylierungsmaschinerie für N-Ras-Proteine wurde untersucht, ob neben den farnesylierten Ras-Proteinen auch andere Proteine mit alternativen Membranankersystemen am Golgi-Apparat palmitoyliert werden und dort in den Kreislauf eintreten. Um diese Frage zu beantworten, wurden N-myristoylierte Proteine sowie Proteine, die keinen stabilen Membrananker besitzen und nur reversibel palmitoyliert werden können, untersucht.

Dafür wurden die entsprechenden N-myristoylierten Peptide von G α i und Fyn und die nicht lipidierte N-terminale Peptidsequenzen von Gap43 am polymeren Träger mit 3-11% Ausbeute synthetisiert. Als Negativkontrollen wurden die N-terminalen Peptidsequenzen in denen die palmitoylierbaren Cysteine durch Serine ersetzt wurden synthetisiert. Mit ihnen konnte man nach der Proteinligation die regiospezifische Palmitoylierung nachweisen. Mittels der MIC-Ligationstechnik wurden Fusionsproteine aus Cy3-modifiziertem N-Ras Δ 1-181 und eGFP mit den synthetisierten N-terminalen

Peptiden von Gαi (40, 41), Fyn (44, 45) und Gap43 (43, 46) in 4-27% Ausbeute hergestellt (Abbildung 51).



Protein	Peptid	Ausbeute	Protein	Peptid	Ausbeute
N-Ras- Δ 1-181	Gai (40)	22%	eGFP	Gap43* (47)	5%
	Gai* (41)	24%		Gai (40)	23%
	Fyn (44)	20%		Gai* (41)	21%
	Fyn* (45)	25%		Fyn (44)	26%
	Gap43 (46)	4%		Fyn (45)	27%

Abbildung 51: Zusammenfassung der synthetisierten Peptide und Proteine für die Aufklärung des Protein Acylierungskreislaufes. *Die Cysteine dieser Sequenz wurden durch Serine ausgetauscht.

In einer Kombination aus Mikroinjektion und „life-time imaging“, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. BASTIAENS durchgeführt wurde, konnte der

Acylierungskreislauf von semisynthetischen Proteinen mit unterschiedlichen Membranankersystemen unter Zuhilfenahme des „kinetic trappings“ untersucht werden (Abbildung 52). Dabei hat sich gezeigt, dass die Cy3-modifizierten N-Ras Δ 1-181 Fusionsproteine basierend auf dem myristoylierten N-Terminus von G α i und dem nicht lipidierten, nur eine intrinsische Membranaffinität besitzenden N-Terminus von Gap43 mit einer ähnlichen Kinetik wie N-Ras am Golgi-Apparat palmitoyliert werden. Durch den Einsatz von GFP-G α i und GFP-Fyn Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, dass die dreidimensionale Struktur des Ras-Proteins für den Acylierungszyklus nicht notwendig ist. Diese semisynthetischen Proteine werden am Golgi-Apparat mit einer zu N-Ras ähnlichen Kinetik, palmitoyliert. Damit konnte auch die publizierte Meinung, der Palmitoylierungsort von Fyn sei die Plasmamembran, widerlegt werden.

Zusammen mit den Ergebnissen der Ras-Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass die drei Klassen peripherer Membranproteine - in Bezug auf ihre Membrananker (farnesyliert, N-myristoyliert, nicht lipidiert und nur eine intrinsische Membranaffinität besitzend) - an der Oberfläche des Golgi-Apparates palmitoyliert werden. In Zusammenhang mit der sekretorischen Funktion des Golgi-Apparates ermöglicht dies einen gerichteten Kreislauf. In diesem werden periphere Membranproteine am Golgi-Apparat palmitoyliert, dadurch dort stabil in der Membran verankert und über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran transportiert. Nach der Depalmitoylierung verlieren die Proteine ihre spezifische Lokalisierung, verteilen sich über alle Endomembranen und können dann am Golgi-Apparat durch Palmitoylierung eingefangen und dem Kreislauf wieder zugeführt werden.

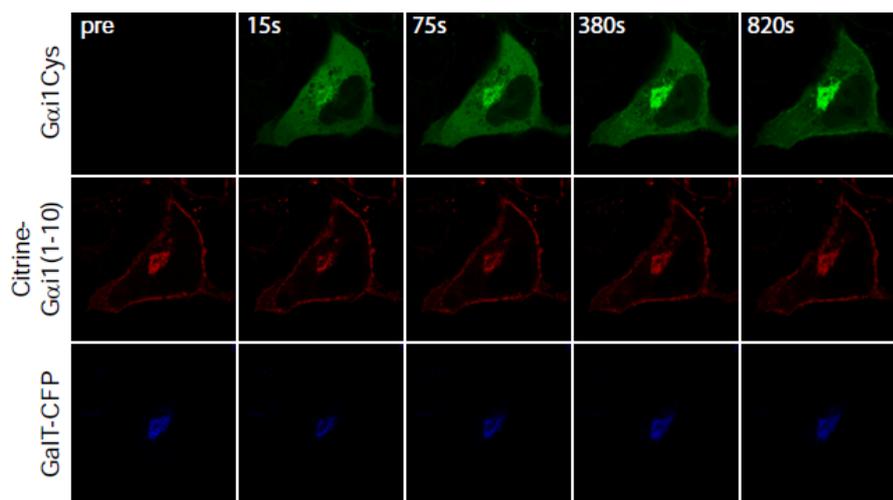


Abbildung 52: Nach Mikroinjektion von Cy3-N-Ras-G α i wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch konfokale Mikroskopie die Verteilung der Proteinsonde in der Zelle quantitativ beobachtet. GalT-CFP: Golgi-Marker; Citrine-G α i(1-10): Lokalisierung von G α i.

6. Experimenteller Teil

6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

NMR-Spektren wurden mit einem Varian Mercury-VX 400, einem Bruker Avance DRX 500 und einem Varian Unity Inova 600 aufgenommen. Die in ppm angegebenen chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das jeweilige Restsignal des nicht deuterierten Lösungsmittels. Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, bs = breites Singulett, m = Multiplett. Alle Zuordnungen wurden wenn notwendig auf Basis entsprechender 2-D-Spektren (HSQC, HMBC, TOCSY, COSY) gemacht. Die ^{13}C -Spektren wurden immer am Bruker Avance DRX 500 aufgenommen unabhängig davon an welchem Gerät das ^1H -Spektrum gemessen wurde.

Optische Drehungen wurden auf einem Schmidt & Hänsch Polartronic HHP Polarimeter ermittelt und sind auf die Wellenlänge der Natrium-D-Linie (589 nm) bezogen. Die Konzentration c in g/ 100 ml und das verwendete Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Hochaufgelöste Massen wurden mit einer HPLC Agilent 1100 Series, kombiniert mit einem Massenspektrometer mit LTQ Orbitrap und Nano-Elektrospray-Ionisation aufgenommen. Es wurden C18-Dionex Säulen verwendet.

MALDI-TOF Massenspektren wurden an einem Voyager DETM Pro Biospectrometry Workstation Spektrometer der Firma PerSeptive Biosystems gemessen.

Gekoppelte Liquid Chromatography-Massenspektrometrie (LC-MS) wurde an einem Agilent Series 1100-System der Firma Hewlett Packard mit einer CC 250/4 Nucleosil 120-5 C4 oder einer C18 Gravity-Säule der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Das ESI-Massenspektrometer war ein LCQ Advantage MAX der Firma Finnigan. Detektion: 210 und 254 nm; Flussrate 1 ml/min.

Laufmittel. A: 0.1 % HCOOH in H₂O; B: 0.1 % HCOOH in Acetonitril:

Sofern nicht anders angegeben, wurde folgender Gradient auf der C18- und der C4-Säule verwendet:

Gradient (**C4**): 1 min 10 % B → 100% B 10 min → 12 min 100 % B.

Gradient (**C4***): 1 min 20 % B → 100% B 10 min → 12 min 100 % B.

Gradient (**C18**): 1 Min 10 % B → 100% B 10 min → 12 min 100 % B.

Für die **MS-gekoppelte, präparative HPLC** wurde folgendes System verwendet: Agilent Series 1100/LC/MSD VL (ESI); Vorsäule: VP50/21 Nucleodur C18 Gravity 5 µm, Hauptsäule: VP125/21 Nucleodur C18 Gravity 5 µm, (beide Macherey&Nagel); Detektion: 210 und 254 nm; Flussrate: 25 ml/min; Detektion: 210 und 254 nm. Das ESI-Massenspektrometer war ein LCQ Advantage MAX der Firma Finnigan. Als Lösungsmittel für die Ionisierung wurde Wasser/Acetonitril 1:1 + 0.1 % Ameisensäure verwendet. Wasser für HPLC-Trennungen wurde durch ein Milli-Q-System mit Q-Gard 2-Kartuschen der Firma Millipore gereinigt.

Zum Einengen der Substanzen nach der präparativen HPLC-Trennung wurde ein alpha 2-4 Gefriertrockner der Firma Christ verwendet.

Für die **mikrowellenunterstützte Peptidsynthese** wurde der „Liberty - 12 Channel Automated Peptide Synthesizer“ der Firma *CEM*® verwendet.

Für die **Dünnschichtchromatographie (DC)** wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck verwendet. Laufmittel und R_F-Werte sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben.

Zur Detektion wurden UV-Licht (λ = 254 nm) und folgende Anfärbereagenzien verwendet:

Reagenz A: 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer(IV)-sulfat und 6 ml konz. Schwefelsäure in 94 ml Wasser,

Reagenz B: 0.5%ige Lösung von Kaliumpermanganat in Wasser.

Für die **präparative Säulenchromatographie** wurde Kieselgel der Firma Acros mit der Korngröße 35-70 µm verwendet.

Lösungsmittel wurden in wasserfreier Form eingesetzt:

Diethylether, Tetrahydrofuran und Methanol wurden in getrockneter Form über Molsieb von der Firma Fluka bezogen. Dichlormethan und Acetonitril wurden über Calciumhydrid getrocknet und vor Gebrauch destilliert.

Die **polymeren Träger** für die Peptidsynthese an der festen Phase wurden von den Firmen Novabiochem bezogen. Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen

SIGMA-ALDRICH, ACROS, Fluka oder ABCR erworben und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Beladung von 2-Chlorotriylchlorid-Harz mit Fmoc geschützten Aminosäuren

In einem ausgeheizten Rosenbaum-Reaktor wird 1.00 g (1.6 mmol) 2-Chlorotriylchlorid-Harz (Beladung 1.6 mmol/g) über Nacht unter Hochvakuum getrocknet. 1.20 Äq. (1.92 mmol) einer entsprechenden Fmoc geschützten Aminosäure werden ebenso über Nacht im Hochvakuum in einem ausgeheizten Kolben getrocknet. Die Fmoc-Aminosäure wird in 10 ml trockenem DCM gelöst und mit 1.12 ml DIPEA (6.4 mmol, 4.00 Äq.) versetzt. Die Lösung wird unter Argonatmosphäre zum 2-Chlorotriylchlorid-Harz in den Rosenbaumreaktor überführt und für 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird das beladene Harz für 15 min mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), dreimal DCM, dreimal DMF und dreimal mit DCM gewaschen und unter Hochvakuum über Nacht getrocknet.

AAV 2: Beladung von 2-Chlorotriylchlorid-Harz mit FmocLys(Boc)OAll

In einer Lösung von 10 ml trockenem DCM/TFA (1:1) werden 724 mg Fmoc-Lys(Boc)-OAll (1.4 mmol) gelöst. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel durch coevaporieren mit Toluol entfernt und der Rückstand 16 h unter Hochvakuum über Nacht getrocknet.

Der feste Rückstand wird in 7 ml trockenem DCM gelöst und es werden 0.97 ml DIPEA (5.6 mmol, 4.0 Äq.) zugegeben. Diese Lösung wird zu 1.75 g (2.8 mmol, 2.0 Äq.) 2-Chlorotriylchlorid-Harz (Beladung 1.6 mmol/g) gegeben, das zuvor 16 h im Vakuum getrocknet wurde. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend abfiltriert. Danach wird das Harz 30 min mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren wird das Harz jeweils fünfmal mit DCM, DMF, MeOH und DCM gewaschen und für 16 h im Hochvakuum getrocknet. Die Bestimmung des Harz-Beladungsgrades anhand der Fmoc-Gruppen mittels UV-Spektroskopie nach AAV 4 ergab eine Beladung von 0.4-0.5 mmol/g.

AAV 3: Beladung von Rink-Amid-Harz

Es werden 138 mg (0.10 mmol) Fmoc geschütztes Rink-Amid-Harz (Beladung: 0.72 mmol/g) in 5 ml DMF für 10 min suspendiert. Das gequollene Harz wird dann mit weiteren 5 ml DMF gewaschen. Die Fmoc Schutzgruppe wird dreimal mit 5 ml DMF/Piperidin/DBU (96:2:2) für jeweils 10 min entschützt. Nach fünf Waschgängen mit jeweils 5 ml DMF werden 4.0 Äq. (0.40 mmol) der entsprechenden Fmoc geschützten Aminosäure sowie 165 mg HCTU (0.40 mmol, 4.0 Äq.) in 5 ml DMF gelöst und mit 0.14 ml DIPEA (0.80 mmol, 8.0 Äq.) versetzt. Die Lösung wird zum frisch entschützten Rink-Amid-Harz gegeben und für 1 h geschüttelt. Danach wird das beladene Rink-Amid-Harz fünfmal mit DMF gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

AAV 4: Bestimmung des Harz-Beladungsgrades von Fmoc-Gruppen mittels UV-Spektroskopie

Eine Lösung von 3-4 mg eines mit einer Fmoc geschützten Aminosäure beladenen Harz wird in 10 ml DMF/Piperidin (8:2) 10 min geschüttelt. Anschließend wird die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 301 nm ($\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Beladung lässt sich mittels des Lambert-Beer-Gesetzes berechnen.

AAV 5: Entschützung von C-terminalen Allylestern an der festen Phase

Zur zur Spaltung des Allylesters werden 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotrityl Harz (Beladung 0.40 mmol/g) (0.1 mmol) 30 min im Argonstrom entgast. 0.19 ml Phenylsilan (1.5 mmol, 15 Äq.) und 5 ml trockenes THF werden 15 min im Ultraschallbad entgast und zusammen mit 5.8 mg Pd(PPh₃)₄ (5 μmol , 0.05 Äq.) und dem beladenen 2-Chlorotrityl Harz unter Schutzgas 16 h geschüttelt. Dabei wird eine Braunfärbung der Lösung beobachtet.

Anschließend wird das Harz solange mit THF, DMF, DCM/MeOH und wieder mit DMF gewaschen bis die Waschlösung keine Färbung mehr zeigt.

AAV 6: Kupplung eines Amins mit einer an der festen Phase immobilisierten Carbonsäure

Es werden 287 mg (0.10 mmol) eines nach AAV 2 und AAV 5 mit Fmoc-Lys-OH beladenen Harzes eingesetzt. Eine Lösung von 0.22 mmol (2.2 Äq.) einer entsprechenden Aminosäure werden mit 114.5 mg PyBOP (0.22 mmol, 2.2 Äq.), 50.6 μl N-Methylmorpholin (0.46 mmol, 4.6 Äq.) in 5 ml DMF werden 5 min voraktiviert und dann mit dem entsprechenden Harz suspendiert.

Nach 16 h Schütteln bei Raumtemperatur wird dreimal mit DMF und anschließend mit DCM gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

AAV 7: Festphasenpeptidsynthese

Eine Lösung von 0.10 mmol eines mit einer Fmoc geschützten Aminosäure beladenen Harzes wird dreimal für 10 min mit 5 ml DMF/Piperidin/DBU (96:2:2) entschützt und danach fünfmal mit jeweils 5 ml DMF gewaschen. Eine Lösung von 4.0 Äq. (0.40 mmol) einer Fmoc geschützter Aminosäure und 165 mg HCTU (0.40 mmol, 4.0 Äq.) in 5 ml DMF werden mit 0.14 ml DIPEA (0.80 mmol, 8.0 Äq.) versetzt. Die Lösung wird zu frisch entschütztem, an der festen Phase gebundenem Amin gegeben und für 1-2 h geschüttelt. Danach wird fünfmal mit jeweils 5 ml DMF gewaschen. Für Doppelkupplungen wird die entsprechende Prozedur ohne anfängliche Fmoc Entschätzung noch einmal durchgeführt.

AAV 8: Festphasenpeptidsynthese am CEM™ Microwave Peptide Synthesizer

Sowohl die Peptidkupplung als auch die Fmoc-Entschätzung wurden mikrowellenunterstützt durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, werden für die Peptidsynthese folgende Lösungsmittel und Konzentrationen verwendet: Aminosäuren (DMF, 0.2 mol/l), HCTU (DMF, 0.5 mol/l) und DIPEA (NMP, 2 mol/l). Die Fmoc-Abspaltung wird mit DMF/Piperidin/DBU (96:2:2) durchgeführt.

Sowohl die Fmoc-Entschätzung als auch die Aminosäurekupplungen werden doppelt ausgeführt. Für die Peptidsynthese werden folgende Mikrowelleneinstellungen verwendet:

Peptidkupplungen	Leistung/W	Temperatur/°C (Obergrenze)	Zeit/s
Standardkupplung	20	75	300
	0	75	1800
Arginin-Kupplung	25	75	300
	0	75	1500
Cystein-Kupplung	25	50	240
	0	50	120
Fmoc-Entschätzung			
1. Entschätzung	40	75	30
2. Entschätzung	25	75	180

AAV 9: Orthogonale Alloc-Abspaltung von am Harz immobilisierten Peptiden

Nach dem Aufbau des Zielpeptids an der festen Phase werden in einem 0.1 mmolaren Ansatz die Alloc-Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen durch Behandeln mit 46 mg (0.04 mmol, 0.4 eq) Pd(PPh₃)₄ in 5 ml entgastem Piperidin/DMF (4:1) für 16 h unter Schutzgasbedingungen, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur abgespalten. Die feste Phase wird danach mit 0.02 mol/L N,N-Diethyldithiocarbamidsäure in NMP, DMF und DCM fünfmal gewaschen und über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

AAV 10: Orthogonale Mmt-Abspaltung von am Harz immobilisierten Aminen

Nach dem Aufbau des Zielpeptids an der festen Phase werden in einem 0.1 mmolaren Ansatz die Mmt-Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen durch die Behandlung mit 10 ml DCM/HFIP/TFE/TES (6.5:2:1:0.5) für 3 h bei Raumtemperatur abgespalten. Die feste Phase wird danach dreimal mit DCM gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

AAV 11: Abspaltung und Aufarbeitung analytischer Probenmengen von 2-Chlorotrityl-Harz

Zur Abspaltung des entsprechenden Peptids von 2-Chlorotrityl-Harz werden 5-10 mg des polymeren Trägers mit 2 ml DCM/TES/TFA (97:2:1) für 1 h bei Raumtemperatur suspendiert. Nach dem Abfiltrieren wird das Filtrat mit Toluol coevaporiert. Zur weiteren Aufarbeitung werden polybasische Proben in einer minimalen Menge Methanol gelöst und in kaltem Et₂O präzipitiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Das entstandene Pulver wird in Wasser gelöst und mittels LC-MS untersucht.

Für alle nicht-polybasischen Proben wird das Filtrat mit Toluol coevaporiert, der Rückstand in Methanol aufgenommen und direkt mittels analytischer LC-MS untersucht.

AAV 12: Abspaltung und Aufarbeitung analytischer Probenmengen von Rink-Amid-Harz

Zur Abspaltung des entsprechenden Peptids von Rink-Amid-Harz werden 5-10 mg des polymeren Trägers mit 2 ml TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5) für 1 h bei Raumtemperatur suspendiert. Nach dem Abfiltrieren wird das Filtrat mit Toluol coevaporiert. Zur

weiteren Aufarbeitung werden polybasische Proben in einer minimalen Menge TFA gelöst und in kaltem Et₂O präzipitiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Das entstandene Pulver wird in Wasser gelöst und mittels LC-MS untersucht.

Für alle nicht polybasischen Proben wird das Filtrat mit Toluol coevaporiert, der Rückstand in Methanol aufgenommen und direkt mittels analytischer LC-MS untersucht.

AAV 13: Abspaltung und Aufarbeitung quantitativer Probenmengen von 2-Chlorotrityl-Harz

Zur quantitativen Abspaltung der entsprechenden 0.1 mmolaren Probe von 2-Chlorotrityl-Harz wird der polymere Träger mit 10 ml DCM/TES/TFA (97:2:1) für 1 h bei Raumtemperatur suspendiert. Nach dem Abfiltrieren und Waschen des polymeren Trägers mit DCM, MeOH und DCM/MeOH wird das vereinigte Filtrat mit Toluol coevaporiert. Zur weiteren Aufarbeitung werden polybasische Proben in einer minimalen Menge Methanol gelöst und in kaltem Et₂O präzipitiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in Wasser gelöst und lyophilisiert.

Der polymere Träger wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet und nochmals mit 10 ml DCM/TES/TFA (95:2:3) für 1 h bei Raumtemperatur suspendiert. Nach dem Abfiltrieren und intensivem Waschen mit DCM, MeOH und DCM/MeOH wird das vereinigte Filtrat mit Toluol coevaporiert. Zur weiteren Aufarbeitung werden polybasische Proben in einer minimalen Menge Methanol gelöst und in kaltem Et₂O präzipitiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in Wasser gelöst und lyophilisiert.

Die Lyophilisate werden mittels analytischer LC-MS untersucht und mit einer präparativen HPLC gereinigt. Die vereinigten Produkt Fraktionen werden anschließend nochmals lyophilisiert.

AAV 14: Abspaltung und Aufarbeitung quantitativer Probenmengen von Rink-Amid-Harz

Zur quantitativen Abspaltung der entsprechenden 0.1 mmolaren Probe von Rink-Amid-Harz wird der polymere Träger mit 10 ml TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5) für 3 h bei Raumtemperatur suspendiert. Nach dem Abfiltrieren und intensivem Waschen mit DCM wird das vereinigte Filtrat mit Toluol coevaporiert. Zur weiteren Aufarbeitung werden polybasische Proben in minimaler Menge TFA gelöst und in kaltem Et₂O präzipitiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in Wasser gelöst und lyophilisiert.

Das Lyophilisat wird in Wasser aufgenommen, mittels analytischer LC-MS analysiert und mittels präparativer HPLC gereinigt.

Für alle nicht polybasischen Proben wird das Filtrat mit Toluol coevaporiert, der Rückstand in Methanol aufgenommen und direkt mittels analytischer LC-MS untersucht sowie durch die präparative HPLC gereinigt. Die vereinigten Produkt Fraktionen werden anschließend nochmals lyophilisiert.

6.3 Versuche zu Kapitel 4.1.2

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-S-farnesyl-L-Cystein 3 [Fmoc-Cys(Far)]

Eine Lösung von 1.0 g (5.7 mmol) L-Cystein Hydrochlorid in 26 ml 4 N Ammoniak/Methanol-Lösung wurde unter Schutzgas auf 0°C gekühlt. Nach 5 min wurde 1.38 ml (5.7 mmol, 1.0 eq) Farnesylbromid zugetropft. Man rührt 3 h bei 0°C und 1 h bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der verbleibende Feststoff wird mit Pentan (3 x 10 ml) gewaschen und anschließend wurden 50 ml Dichlormethan zugegeben. Die Suspension wird in einem Eisbad gekühlt und 0.88 ml (6.3 mmol, 1.1 Äq.) Triethylamin und 2.12 g (6.3 mmol, 1.1 Äq.) Fmoc-Succinimid zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Die Ausbeute nach säulenchromatographischer Reinigung (Laufmittel: DCM/MeOH 95:5) betrug 1.3 g (3.7 mmol, 40%) eines gelbstichigen Öls.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7.75 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.59 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.40 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.29 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 5.97 (m, 1H, NH), 5.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH=C Far), 5.11 (m, 2H, 2x CH=C Far Far), 4.65 (m, 1H, α-CH Cys), 4.40 (m, 2H, CH₂ Fmoc), 4.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH Fmoc), 3.21 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, S-CH₂ Far), 3.10 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 7.0 Hz, 1H, β-CH_{2a} Cys), 2.94 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J* = 7.0 Hz, 1H, β-CH_{2a} Cys), 1.92-2.15 (m, 8H, 2x CH₂-CH₂ Far), 1.66-1.61 (m, 6H, 2x CH₃ Far), 1.55 (s, 6H, 2x CH₃ Far).

¹³C-NMR (100.5 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 171.9 (CO₂CH₃), 156.5 (OCONH Fmoc); 144.0, 141.5, 140.2 (3x C_q arom. Fmoc), 135.5, 131.4, 127.9, 127.4, 125.4, 124.7, 124.1, 120.2, 119.9 (2x C_q arom. Dansyl, 3x HC=C Far, 4x CH arom. Fmoc), (67.7 (CH₂

Fmoc), 54.2 (α -CH Cys), 47.3 (CH Fmoc), 40.0, 39.9 (2x CH₂-CH₂ Far), 33.7 (S-CH₂ Far), 30.4 (β -CH₂ Cys), 27.2, 26.7 (2x CH₂-CH₂ Far), 26.0, 18.0, 16.4, 16.3 (4x CH₃ Far)

R_F-Wert (DCM/MeOH 9:1) = 0.70

LC-MS: 9.03 min (C4*); 548.13 [M+H]⁺

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturbekannten Werten überein.^[234]

S-Farnesyl-L-cystein-methylester 2 [Cys(Far)-OMe]

Eine Lösung von 1.96 g Cysteinmethylester Hydrochlorid (11.0 mmol) in 50 ml 4 N Ammoniak/Methanol-Lösung wurde unter Schutzgas auf 0 °C abgekühlt. Es wurden 2.64 g Farnesylchlorid (11.0 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung 3 h bei 0 °C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel: DCM → DCM/MeOH 9:1). Die Ausbeute betrug 2.98 g (8.8 mmol, 80%) eines gelbstichigen Öls.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.31-5.12 (m, 1H, CH=C Far), 5.10-5.01 (m, 2H, 2x CH=C Far), 3.69 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.60 (dd, *J* = 7.67, 4.64 Hz, 1H, α -CH), 3.20-3.07 (m, 2H, S-CH₂ Far), 2.84 (dd, *J* = 13.56, 4.64 Hz, 1H, β -CH₂), 2.64 (dd, *J* = 13.56, 7.68 Hz, 1H, β -CH₂), 2.11-1.97 (m, 8H, 2x CH₂-CH₂ Far), 1.96-1.89 (m, 2H, NH₂), 1.66-1.61 (m, 6H, 2x CH₃ Far), 1.55 (s, 6H, 2x CH₃ Far).

¹³C-NMR (100.5 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 174.2 (CO₂CH₃), 139.3 (HC=C, Far), 135.1 (HC=C, Far), 131.0 (HC=C, Far), 124.1 (HC=C, Far), 123.5 (HC=C, Far), 119.7 (HC=C, Far), 54.0 (α -CH), 51.9 (CO₂CH₃), 39.4 (CH₂-CH₂ Far), 39.4 (CH₂-CH₂ Far), 36.1 (β -CH₂), 29.6 (S-CH₂ Far), 26.5 (CH₂-CH₂ Far), 26.2 (CH₂-CH₂ Far), 25.4 (CH₃ Far), 17.4 (CH₃ Far), 15.9 (CH₃ Far), 15.8 (CH₃ Far).

R_F-Wert (DCM/MeOH 95:5) = 0.10

LC-MS: 6.12 min (C4); 340.09 [M+H]⁺

Die analytischen Daten stimmen mit den aus der Literatur bekannten Werten überein.^[178]

***N* α -Fluorenylmethyloxycarbonyl-*N* ϵ -*tert*-butyloxycarbonyl-L-lysin-allylester 1
[Fmoc-Lys(Boc)-OAlI]**

Zu einer Lösung von 0.47 g Fmoc-Lys-(Boc) (1.00 mmol) in 10 ml trockenem Methanol wurden unter Argonatmosphäre 163 mg Cäsiumcarbonat (0.50 mmol, 0.5 Äq.) langsam zugegeben, wobei es zu einer Gasentwicklung kam. Nach 1 h Rühren wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Toluol coevaporiert und für 10 Minuten unter Hochvakuum getrocknet.

Der Feststoff wurde in 10 ml trockenem DMF gelöst und 0.87 ml Allylbromid (1.10 mmol 1.1 Äq.) zugegeben. Nach 2 h Rühren wurde der entstandene Niederschlag über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand unter Hochvakuum getrocknet.

Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte durch Säulenchromatographie (Laufmittel: cHex \rightarrow cHex/EE 1:1). Die Ausbeute betrug 397 mg (0.78 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7.76 (d, $J = 7.54$ Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.61 (d, $J = 7.54$ Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.40 (t, $J = 7.47$ Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.31 (t, $J = 7.44$ Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 5.99-5.84 (m, 1H, CH=CH₂ allyl), 5.45-5.38 (m, 1H, NH), 5.37-5.30 (m, 1H, CH=CH allyl), 5.29-5.24 (m, 1H, CH=CH allyl), 4.67-4.34 (m, 5H, α -CH Lys, o-CH₂ Fmoc, O-CH₂ allyl), 4.23 (t, $J = 6.86$ Hz, 1H, CH Fmoc), 3.11 (bs, 2H, ω -CH₂ Lys), 1.95-1.82, 1.81-1.66 (m, 2H, β -CH₂ Lys), 1.58-1.48 (m, 2H, δ -CH₂ Lys), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃ Boc), 1.40-1.32 (m, 2H, γ -CH₂ Lys).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 172.1, 156.0, 143.9, 143.7, 141.3, 131.5, 127.7, 127.0, 125.1, 120.0, 119.0, 113.1, 67.0, 66.0, 53.8, 47.2, 40.1, 32.2, 29.6, 28.4, 22.3.

LC-MS: 9.65 min (C4); 508.6 [M+H]⁺

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.0^\circ$ (DCM, c = 1)

R_f-Wert (cHex/EE 1:1) = 0.53

Die analytischen Daten stimmen mit den aus der Literatur bekannten Werten überein.^[111]

***N* α -Fluorenylmethyloxycarbonyl- ϵ -*N*-dansyl-L-lysin 4 [Fmoc-Lys(Dansyl)]**

Eine Lösung von 1.00 g Fmoc-Lys(Boc) (2.13 mmol) in 20 ml DCM/TFA (1:1) wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter vermindertem Druck mit Toluol coevaporiert und über Nacht im Hochvakuum

getrocknet. Das Rohprodukt wurde in 20 ml trockenem DCM gelöst und mit 0.27 ml Triethylamin (6.39 mmol, 3.0 Äq.) und 0.63 g Dansylchlorid (2.34 mmol, 1.1 Äq.) versetzt und wurde anschließend 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Ausbeute betrug nach säulenchromatographischer Reinigung (Laufmittel: cHex/EE 1:1) 0.76 g (1.29 mmol, 60%) eines grünlichen Schaums.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$ 1:1) δ/ppm : 8.43 (d, $J = 8.50$ Hz, 1H CH arom. Dansyl), 8.31 (d, $J = 8.62$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.08 (d, $J = 7.11$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.73 (dd, $J = 7.34, 2.91$ Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.60 (m, 2H, CH arom. Fmoc), 7.48 (dd, $J = 16.73, 8.89$ Hz, 2H, 2x CH arom. Dansyl), 7.35-7.30 (m, 2H, CH arom. Fmoc), 7.25 (t, $J = 7.43$ Hz, 2H, CH arom. Fmoc), 7.13 (d, $J = 7.48$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.02 (d, $J = 6.76$ Hz, 1H, NH), 4.32-4.22 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4.16 (t, $J = 6.98$ Hz, 1H, CH Fmoc), 3.90 (dt, $J = 8.37, 5.00$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 2.81 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.77 (dd, $J = 13.08, 6.72$ Hz, 2H, $\varepsilon\text{-CH}_2$), 1.70-1.43 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.39-1.30 (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2$), 1.29-1.18 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$ 1:1): 173.9 (COOH), 155.7 (OCONH Fmoc), 151.0 (C_q arom. Dansyl), 143.4, 143.3, 140.4, 135.7, 129.0, 129.0, 127.9, 127.2, 127.1, 126.6, 124.7, 122.7, 119.4, 118.9, 114.5 (4x CH arom. Fmoc, 2x C_q arom. Fmoc, 6x CH arom. Dansyl, 3x C_q arom. Dansyl), 65.4 (O- CH_2 Fmoc), 53.5 ($\alpha\text{-CH}$), 46.5 (CH Fmoc), 44.7 (N-C(CH_3) $_2$), 41.9 ($\varepsilon\text{-CH}_2$), 30.4 ($\beta\text{-CH}_2$), 28.5 ($\delta\text{-CH}_2$), 22.2 ($\gamma\text{-CH}_2$).

R_f -Wert (cHex/EE 1:1) = 0.16

LC-MS: 9.48 min (C4); 602.00 $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI): 602.23193 berechnet $[\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_3\text{S}]$, gefunden: 602.2314531 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$[\alpha]^{20} = 1.7^\circ$ (DCM, $c = 1$)

Serinmethylester Hydrochlorid 5 [Ser-OMe]

Zu einer Lösung von 1.00 g Serin Hydrochlorid (7.10 mmol) in eisgekühltem MeOH wurden unter fortlaufender Eiskühlung langsam 0.51 ml Acetylchlorid (63.9 mmol, 9.0 Äq.) zugetropft. Danach wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reaktion verlief quantitativ und ergab 1.1 g (7.10 mmol, 100%) eines farblosen Feststoffs.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 4.04 (t, $J = 3.51$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 3.80 (d, $J = 3.39$ Hz, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 3.70 (s, 3H, CO_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 168.4 (COCH_3), 59.4 ($\beta\text{-CH}_2$), 54.4 ($\alpha\text{-CH}$), 52.7 (COCH_3).

R_f -Wert: (cHex/EE 1:9) = 0.17

$[\alpha]^{20} = 18.3^\circ$ (DCM, $c = 1$)

***N,O*-Ditryl-L-serin-methylester 6 [*Trt-Ser(Trt)*-OMe]**

Eine Lösung von 1.56 g Ser-OMe **5** (10.0 mmol), 4.92 ml Triethylamin (35.0 mmol, 3.5 Äq.) und 5.57 g Tritylchlorid (20.0 mmol, 2.0 Äq.) in 20 ml CHCl_3 wurden für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgetrennt (Laufmittel: PE/EE 9:1). Die Ausbeute betrug 3.20 g (5.31 mmol, 53%) eines weißen Pulvers.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 7.51-7.42 (m, 12H, 12x *CH* arom. Trityl), 7.35-7.14 (m, 18H, 18x *CH* arom. Trityl), 3.61-3.52 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 3.38 (ddd, $J = 62.57, 9.15, 5.69$ Hz, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 3.23 (s, 3H, CO_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 173.1 (COCH_3), 145.3, 143.2 (C_q arom. Trityl), 128.1, 127.9, 127.5, 127.4, 126.7, 126.0 (6x *CH* arom. Trityl), 85.8 (O-C_q Trityl), 70.2 (N-C_q Trityl), 65.7 ($\beta\text{-CH}_2$), 56.0 ($\alpha\text{-CH}$), 51.1 (CO_2CH_3).

R_f -Wert: 0.35 (PE/EE 9:1)

LC-MS: 11.16 min (C4) ; 603.28 $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI): 604.28462 berechnet $[\text{C}_{42}\text{H}_{38}\text{NO}_3]$, gefunden: 604.28432 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$[\alpha]^{20} = 24.8^\circ$ (DCM, $c = 1.25$)

***O*-Trityl-L-serin-methylester 7 [*Ser(Trt)*OMe]**

Eine Eisbad gekühlte Lösung Lösung von 340 mg *Trt-Ser(Trt)*OMe **6** (0.56 mmol) in 10 ml DCM/TFA 99:1 wurde für 3 min gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel mit Toluol bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck coevapriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgetrennt (Laufmittel EE/PE 1:1 \rightarrow EE). Die Ausbeute betrug 80.6 mg (0.22 mmol, 40%) eines farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7.40-7.35 (m, 6H, 6x CH arom. Trityl), 7.29-7.23 (m, 6H, 6x CH arom. Trityl), 7.23-7.17 (m, 3H, 3x CH arom. Trityl), 3.68 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.56 (t, $J = 4.30$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 3.37 (ddd, $J = 31.80, 8.83, 4.32$ Hz, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.87 (s, 2H, NH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 174.4 (CO_2CH_3), 143.5, 128.5, 127.7, 127.0 (4x CH arom. Trityl), 86.4 (C_q Trityl), 65.4 ($\beta\text{-CH}_2$), 54.9 ($\alpha\text{-CH}$), 51.9 (CO_2CH_3).

R_f -Wert: 0.48 (EE)

LC-MS: 8.24 min (C4) ; 722.6 $[2\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI): 723.34286 berechnet $[\text{C}_{46}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_6]$, gefunden: 723.34031 $[2\text{M}+\text{H}]^+$

$[\alpha]^{20} = 23.0^\circ$ (DCM, $c = 1$)

6.4 Versuche zu Kapitel 4.1.3

S-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-L-lysyl-L-threonyl-L-lysyl-(S-farnesyl)-L-cystein-methylester 8

[Cys(StBu)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-OMe]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotryl-Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) nach AAV 5 C-terminal entschützt und die an der festen Phase immobilisierte Carbonsäure nach AAV 6 mit Cys(Far)-OMe 2 unter Knüpfung einer Amidbindung derivatisiert. Die vollständige Entschützung und Kupplung wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft.

LC-MS: Fmoc-Lys-OH: 6.66 min (C4) ; 369.01 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Fmoc-Lys-Cys(Far)-OMe: 8.83 min (C4) ; 690.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Die Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV 8 mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Alloc), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Thr(Trt) und Fmoc-Cys(StBu) verwendet. Nach dem Aufbau der Zielsequenz am Harz wurden die N-terminale Fmoc Schutzgruppe und die Alloc Schutzgruppen der Lysin Seitenkettenfunktionalitäten nach AAV 9 entschützt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft. Danach wurden gleichzeitig die Trityl Schutzgruppen entfernt und das Peptid quantitativ vom polymeren Träger nach AAV 13 abgespalten und

aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC betrug die Ausbeute 26.1 mg (0.015 mmol, 15%) eines weißen Pulvers.

¹H-NMR (500 MHz, *DMSO-d*₆) δ/ppm: 8.75-7.77 (m, 29H, -NH- Cys(Far)OMe, -NH-Ser, -NH- Thr, 8x -NH- Lys, -NH₂ Cys(StBu), 8x -NH₂ Lys), 5.21-5.02 (m, 3H, 3x CH=C, Far), 4.55-3.92 (m, 13H, 8x α-CH Lys, α-CH Cys(Far)OMe, α-CH Cys(StBu), α-CH Ser, α-CH Thr, β-CH Thr), 3.62 (m, 5H, (-CO₂CH₃ Cys(Far)OMe, β-CH₂ Ser), 3.26-3.05 (m, 4H, β-CH₂ H₂N-Cys(StBu), -S-CH₂- Far), 2.86-2.68 (m, 18H, 8x ε-CH₂ Lys, β-CH₂ Cys(Far)OMe), 2.14-1.84 (m, 8H, 2x CH₂-CH₂ Far), 1.77-1.13 (m, 69H, 8x β-CH₂ Lys, 8x γ-CH₂ Lys, 8x δ-CH₂ Lys, 4x -CH₃ Far, S-C(CH₃)₃), 1.07-1.00 (m, 3H, -CH₃ Thr).

¹³C-NMR (100.5 MHz, *DMSO-d*₆) δ/ppm: 171.5-170.9 (CONHR, 8x Lys, 2x Cys, Ser, Thr, CO₂CH₃ Cys(Far)), 138.7 (HC=C, Far), 134.5 (HC=C, Far), 130.4 (HC=C, Far), 124.1 (HC=C, Far), 123.5 (HC=C, Far), 120.0 (HC=C, Far), 65.8 (β-CH Thr), 57.3 (α-CH Thr), 54.2, 52.5-51.8 (8x α-CH Lys, 2x α-CH Cys, α-CH Ser) 51.3 (-CO₂CH₃ Cys(Far)OMe), 47.8 (S-C(CH₃)₃), 41.6 (β-CH₂ H₂N-Cys(StBu)), 39.6 (2x CH₂-CH₂ Far), 39.0 (8x ε-CH₂ Lys), 31.8 (β-CH₂ Cys(Far)OMe), 31.7-31.0 (8x β-CH₂ Lys), 29.5 (S-C(CH₃)₃), 28.8 (S-CH₂ Far), 27.0 (8x δ-CH₂ Lys), 26.6 (2x CH₂-CH₂ Far), 25.6 (CH₃ Far), 22.5 (8x γ-CH₂ Lys), 19.7 (CH₃ Thr), 18.1 (CH₃ Far), 15.7 (2x CH₃ Far).

LC-MS: 5.44 min (C18) ; 1743.88 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 872.56051 berechnet [C₈₁H₁₅₄O₁₅N₂₀S₃], gefunden: 872.56131 [M+2H]²⁺
[α]²⁰ = -33.8° (H₂O, c = 0.8)

S-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-glutamyl-L-lysyl-L-threonyl-L-lysyl-(S-farnesyl)-L-cystein-methylester 10

[Cys(StBu)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Glu-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-OMe]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotryl-Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) nach AAV 5 C-terminal entschützt und die an der festen Phase immobilisierte Carbonsäure nach AAV 6 mit Cys(Far)-OMe 2 unter Knüpfung einer Amidbindung derivatisiert. Die vollständige Entschätzung und Kupplung wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft.

LC-MS: Fmoc-Lys-OH: 6.66 min (C4) ; 369.01 [M+H]⁺

Fmoc-Lys-Cys(Far)-OMe: 8.83 min (C4) ; 690.09 [M+H]⁺

Die Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV **8** mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Alloc), FmocGlu(OAll), Fmoc-Thr(Trt) und Fmoc-Cys(StBu) verwendet. Nach dem Aufbau der Zielsequenz am Harz wurden die *N*-terminale Fmoc Schutzgruppe, die Alloc Schutzgruppen der Lysin Seitenkettenfunktionalitäten und der Allyl Ester nach AAV **9** entschützt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV **11** überprüft. Danach wurden gleichzeitig die Trityl-Schutzgruppe entfernt und das Peptid quantitativ vom polymeren Träger nach AAV **13** abgespalten und aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC betrug die Ausbeute 21.4 mg (12 μ mol, 12%) eines braunen Pulvers.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 8.72 (s, 1H, -NH- Lys), 8.55-8.39 (m, 3H, -NH₂- Cys(StBu), -NH- Cys(Far)OMe), 8.26-7.68 (m, 25H, -NH- Glu, -NH- Thr, 7x -NH- Lys, 8x -NH₂ Lys), 5.22-5.02 (m, 3H, 3x CH=C, Far), 4.54-4.16 (m, 11H, 8x α -CH Lys, α -CH Cys(Far)OMe, α -CH Glu, α -CH Thr), 4.12-3.95 (m, 2H, α -CH Cys(StBu), β -CH Thr) 3.64 (m, 5H, -CO₂CH₃ Cys(Far)OMe, β -CH₂ Ser), 3.25-3.05 (m, 4H, β -CH₂ H₂N-Cys(StBu), S-CH₂ Far), 2.89-2.61 (m, 18H, 8x ϵ -CH₂ Lys, β -CH₂ Cys(Far)OMe), 2.29-2.17 (m, 2H, γ -CH₂ Glu) 2.13-1.81 (m, 10H, 2x CH₂-CH₂ Far, β -CH₂ Glu), 1.79-1.12 (m, 69H, 8x β -CH₂ Lys, 8x γ -CH₂ Lys, 8x δ -CH₂ Lys, 4x -CH₃ Far, S-C(CH₃)₃), 1.03 (s, 3H, -CH₃ Thr).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 173.9 (COOH Glu), 171.5 – 171.3, 170.6, 169.4 (CONHR, 8x Lys, 2x Cys, Glu, Thr, CO₂CH₃ Cys(Far), 138.6 (HC=C, Far), 134.5 (HC=C, Far), 130.6 (HC=C, Far), 124.0 (HC=C, Far), 123.5 (HC=C, Far), 119.9 (HC=C, Far), 65.5 (β -CH Thr), 57.4 (α -CH Thr), 52.3-51.9, (8x α -CH Lys, 2x α -CH Cys, α -CH Glu), 51.6 (-CO₂CH₃ Cys(Far)OMe), 47.9 (S-C(CH₃)₃), 41.1 (β -CH₂ H₂N-Cys(StBu)), 38.9 (2x CH₂-CH₂ Far), 38.6 (8x ϵ -CH₂ Lys), 31.6-31.0 (β -CH₂ Cys(Far)OMe, 8x β -CH₂ Lys), 29.9 (γ -CH₂ Glu), 29.3 (S-C(CH₃)₃), 28.7 (S-CH₂ Far), 26.8-26.5 (8x δ -CH₂ Lys, β -CH₂ Glu), 26.0 (2x CH₂-CH₂ Far), 25.4 (CH₃ Far), 22.2 (8x γ -CH₂ Lys), 19.1 (CH₃ Thr), 17.4 (CH₃ Far), 15.6 (2x CH₃ Far).

LC-MS: 4.27 min (C18) ; 1786.78 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 893.56579 berechnet [C₈₃H₁₅₈O₁₆N₂₀S₃], gefunden: 893.56660 [M+2H]²⁺
 $[\alpha]^{20} = -37.1^\circ$ (H₂O, c = 1)

S-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-L-lysyl-L-threonyl-L-lysyl-L-serin-methylester 11**[Cys(StBu)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Lys-Thr-Lys-Ser-OMe]**

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotryl-Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) nach AAV 5 C-terminal entschützt und die an der festen Phase immobilisierte Carbonsäure nach AAV 6 mit Ser(Trt)OMe 7 unter Knüpfung einer Amidbindung derivatisiert. Die vollständige Entschätzung und Kupplung wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft.

LC-MS: Fmoc-Lys-OH: 6.66 min (C4) ; 369.01 [M+H]⁺
 FmocLysSerOMe: 5.82 min (C4) ; 469.99 [M+H]⁺

Die Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV 8 mit den entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Alloc), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Thr(Trt) und Dansyl-Gly \$1 verwendet. Nach dem Aufbau der Zielsequenz am Harz wurden die Alloc Schutzgruppen der Lysin Seitenkettenfunktionalitäten nach AAV 9 entschützt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft. Danach wurden gleichzeitig die Trityl Schutzgruppen entfernt und das Peptid quantitativ vom polymeren Träger nach AAV 13 abgespalten und aufgearbeitet. Eine weitere Aufreinigung war nicht nötig. Die Ausbeute betrug 25.9 mg (17 µmol, 17%) eines weißen Pulvers.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.76 (d, *J* = 7.53 Hz, 1H, NH Lys), 8.33 (d, *J* = 7.38 Hz, 1H, NH Lys), 8.17-7.79 (m, 27H, 7x NH Lys, NH Ser, NH Cys, 8x NH₂ Lys, NH₂ Cys), 5.26-4.96 (m, 3H, 2x OH Ser, OH Thr), 4.41-4.17 (m, 10H, 8x α-CH Lys, α-CH Cys, α-CH Ser), 4.07 (t, *J* = 6.14, 6.14 Hz, 1H, α-CH Ser), 3.97 (dd, *J* = 10.45, 5.10 Hz, 1H, β-CH Thr), 3.76-3.65 (m, 2H, β-CH₂ Ser), 3.64-3.58 (m, 5H, β-CH₂ Ser, COOCH₃, SerOMe), 3.11 (ddd, *J* = 37.79, 13.82, 6.37 Hz, 2H, β-CH₂ Cys), 2.80-2.69 (m, 16H, 8x ε-CH₂ Lys), 1.77-1.44 (m, 32H, 8x β-CH₂ Lys, 8x δ-CH₂ Lys), 1.40-1.22 (m, 25H, 8x γ-CH₂ Lys, C(CH₃)₃ S-tBu), 1.02 (d, *J* = 6.13 Hz, 3H, CH₃ Thr).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 171.8, 171.8, 171.7, 171.7, 171.6, 171.6, 171.5, 171.4, 170.8, 170.1, 170.1, 169.7, (CONH, 8x Lys, Ser, Thr, Cys, COOCH₃ Ser), 66.6 (β-CH Thr), 61.8, 61.0 (2x β-CH₂ Ser), 58.1 (α-CH Thr), 55.0, 54.8, 52.6, 52.5, 52.4, 52.4, 52.4, 52.3, 52.3, 52.0, 51.8, 51.6 (α-CH, 8x Lys, 2x Ser, Cys, COOCH₃ Ser), 48.0 (C(CH₃)₃, S-tBu), 38.7 (8x ε-CH₂ Lys), 31.6, 31.5, 31.5, 31.5,

31.5, 31.4, 31.2, 31.1 (8x β -CH₂ Lys), 29.4, (C(CH₃)₃, S-tBu), 26.6, 26.6, 22.3, 22.2, 22.1, 22.1, 22.0, 22.0 (8x γ -CH₂ Lys), 19.4 (CH₃ Thr).

LC-MS: 0.86 min (C18) ; 1523.65 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 762.47845 berechnet [C₆₆H₁₃₂O₁₆N₂₀S₂], gefunden: 762.47845 [M+2H]²⁺

$[\alpha]^{20} = -34.0^\circ$ (H₂O, c = 1.0)

**S-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-(N-Dansyl)-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-L-lysyl-L-threonyl-L-lysyl-(S-farnesyl)-L-cystein-methylester
12**

**[Cys(StBu)-Lys(Dansyl)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-
OMe]**

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotryl-Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) nach AAV 5 C-terminal entschützt und die an der festen Phase immobilisierte Carbonsäure nach AAV 6 mit Cys(Far)-OMe 2 unter Knüpfung einer Amidbindung derivatisiert. Die vollständige Entschätzung und Kupplung wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft.

LC-MS: Fmoc-Lys-OH: 6.66 min (C4) ; 369.01 [M+H]⁺

Fmoc-Lys-Cys(Far)-OMe: 8.83 min (C4) ; 690.09 [M+H]⁺

Die Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV 8 mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Alloc) FmocLys(Dansyl) 4, Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Thr(Trt) und Fmoc-Cys(StBu) verwendet. Nach dem Aufbau der Zielsequenz am Harz wurden die N-terminale Fmoc Schutzgruppe und die Alloc Schutzgruppen der Lysin Seitenkettenfunktionalitäten nach AAV 9 entschützt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft. Danach wurden gleichzeitig die Trityl Schutzgruppen entfernt und das Peptid quantitativ vom polymeren Träger nach AAV 13 abgespalten und aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC betrug die Ausbeute 16.8 mg (8 μ mol, 8%) eines weißen Pulvers.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 8.68-8.61 (m, 1H, NH Lys), 8.46 (d, J = 8.53 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.45-8.41 (m, 1H, NH Cys(Far)OMe), 8.40-8.33 (m, 2H, NH₂ Cys(StBu)), 8.29 (d, J = 8.63 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.13-7.72 (m, 28H, NH Ser, NH Thr, 8x NH Lys, 8x NH₂ Lys, NH-SO₂ Lys, CH arom. Dansyl), 7.62 (dd, J =

8.35, 7.45 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.58 (t, $J = 8.10$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.26 (d, $J = 7.46$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 5.29-4.96 (m, 3H, 3x CH=C, Far), 4.57-4.17 (m, 12H, 9x α -CH Lys, α -CH Cys(Far)OMe, α -CH Ser, α -CH Thr), 4.10-3.92 (m, 2H, α -CH Cys(StBu), β -CH Thr), 3.67-3.54 (m, 5H, CO₂CH₃ Cys(Far)OMe, β -CH₂ Ser), 3.25-2.90 (m, 4H, β -CH₂ H₂N-Cys(StBu), S-CH₂ Far), 2.83 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.80-2.70 (m, 18H, 8x ϵ -CH₂ Lys, β -CH₂ Cys(Far)OMe), 2.11-1.81 (m, 8H, 2x CH₂-CH₂ Far), 1.77-1.04 (m, 75H, 9x β -CH₂ Lys, 9x γ -CH₂ Lys, 9x δ -CH₂ Lys, 4x -CH₃ Far, S-C(CH₃)₃), 1.02 (d, $J = 5.90$ Hz, 3H, -CH₃ Thr).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 171.6-169.6 (CONHR, 9x Lys, Ser, Thr), 171.1 (CO₂CH₃ Cys(Far)), 166.5 (CONHR, H₂N-Cys(StBu)), 151.5 (C_q arom. Dansyl) 139.8 (HC=C, Far), 136.5 (HC=C, Far), 136.1 (C_q arom. Dansyl), 135.0 (HC=C, Far), 129.1 (2x C_q arom. Dansyl, CH arom. Dansyl), 127.7 (2x CH arom. Dansyl), 126.6 (HC=C, Far), 123.5 (HC=C, Far-), 123.1 (CH arom. Dansyl), 119.5 (HC=C, Far), 119.1 (CH arom. Dansyl), 115.1 (CH arom. Dansyl), 66.2 (β -CH Thr), 61.4 (β -CH₂ Ser), 57.5 (α -CH Thr), 54.4, 51.9-51.5 (9x α -CH Lys, 2x α -CH Cys, α -CH Ser) 51.7 (-CO₂CH₃ Cys(Far)OMe), 48.0 (S-C(CH₃)₃), 44.8 (-N(CH₃)₂), 40.7 (β -CH₂ H₂N-Cys(StBu)), 39.3 (2x CH₂-CH₂ Far), 38.1 (9x ϵ -CH₂ Lys), 31.3 (β -CH₂ Cys(Far)OMe), 31.4-30.6 (9x β -CH₂ Lys), 29.2 (S-C(CH₃)₃), 28.2 (S-CH₂ Far), 26.5 (9x δ -CH₂ Lys), 25.7 (2x CH₂-CH₂ Far), 24.7 (-CH₃ Far), 21.7 (9x γ -CH₂ Lys), 19.3 (CH₃ Far), 19.1 (CH₃ Thr), 15.6 (2x CH₃ Far).

LC-MS: 4.57 min (C18) ; 1053.30 [M+2H]²⁺

HRMS (ESI): 527.07040 berechnet [C₉₉H₁₈₁O₁₈N₂₃S₄], gefunden: 527.06992 [M+4H]⁴⁺

$[\alpha]^{20} = -22.0^\circ$ (H₂O, c = 0.5)

S-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-L-lysyl-L-threonyl-L-lysyl-(S-farnesyl)-L-cystein 13

[Cys(StBu)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-OH]

An 142 mg eines nach AAV 1 mit Fmoc-Cys(Far) 3 beladenen 2-Chlorotryl Chlorid Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV xx1, 0.70 mmol/g) wurde die Peptidsequenz durch repetitive Anwendung der AAV 7 mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Alloc), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Thr(Trt) und Fmoc-Cys(StBu) verwendet. Nach dem Aufbau der Zielsequenz am Harz wurden die N-terminale Fmoc Schutzgruppe und die Alloc Schutzgruppen der Lysin Seitenkettenfunktionalitäten nach AAV 9 entschützt. Die Vollständigkeit der

Reaktion wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft. Danach wurden gleichzeitig die Trityl Schutzgruppen entfernt und das Peptid quantitativ vom polymeren Träger nach AAV 13 abgespalten sowie aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC betrug die Ausbeute 15.6 mg (9 µmol, 9%) eines weißen Pulvers.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.68-7.69 (m, 29H, -NH- Cys(Far)OH, -NH- Ser, -NH- Thr, 8x -NH- Lys, -NH₂ Cys(StBu), 8x -NH₂ Lys), 5.37-5.02 (m, 3H, 3x CH=C, Far), 4.41-4.18 (m, 11H, 8x α-CH Lys, α-CH Cys(Far)OH, α-CH Ser, α-CH Thr), 4.07-3.89 (m, 2H, α-CH Cys(StBu), β-CH Thr), 3.65-3.53 (m, 2H, β-CH₂ Ser), 3.24-2.96 (m, 4H, β-CH₂ H₂N-Cys(StBu), S-CH₂ Far), 2.89-2.80, 2.70-2.60 (m, 2H β-CH₂ Cys(Far)OH), 2.79-2.71 (m, 16H, 8x ε-CH₂ Lys), 2.10-1.84 (m, 8H, 2x CH₂-CH₂ Far), 1.79-1.16 1.06-1.05 0.91-0.82 (m, 69H, 8x β-CH₂ Lys, 8x γ-CH₂ Lys, 8x δ-CH₂ Lys, 4x -CH₃ Far, S-C(CH₃)₃), 1.02 (d, *J* = 6.18 Hz, 3H, -CH₃ Thr).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 174.4 (CO₂H Cys(Far)-OH), 172.3-169.8 (CONHR, 8x Lys, 2x Cys, Ser, Thr), 138.6 (HC=C, Far), 134.5 (HC=C, Far), 130.5 (HC=C, Far), 124.2 (HC=C, Far), 123.7 (HC=C, Far), 120.2 (HC=C, Far), 66.4 (β-CH Thr), 57.6 (α-CH Thr), 54.7, 52.6-51.6 (8x α-CH Lys, 2x α-CH Cys, α-CH Ser), 47.9 (S-C(CH₃)₃), 39.0 (2x CH₂-CH₂ Far), 38.8-38.4 (8x ε-CH₂ Lys), 31.9 (β-CH₂ Cys(Far)OH), 31.3-29.5 (8x β-CH₂ Lys), 28.5 (S-CH₂ Far), 28.4 (S-C(CH₃)₃), 26.5 (8x δ-CH₂ Lys), 26.1-25.5 (2x CH₂-CH₂ Far), 22.9 (8x γ-CH₂ Lys), 25.4 (CH₃ Far), 19.3 (CH₃ Thr), 17.3 (CH₃ Far), 15.7 (2x CH₃ Far).

LC-MS: 4.07 min (C18) ; 1730.56 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 433.27998 berechnet [C₈₀H₁₅₆O₁₅N₂₀S₃], gefunden: 433.27989 [M+4H]⁴⁺
[α]²⁰ = -33.0° (H₂O, c = 1.0)

S-tert-Butylthio- L-cysteyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-L-lysyl-L-threonyl-L-lysyl-(S-farnesyl)-L-cysteyl-L-valyl-L-isoleucyl-methionin 14
[Cys(StBu)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-Val-Ile-Met-OH]

An 142 mg eines nach AAV 1 mit Fmoc-Met beladenen 2-Chlorotryl Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV xx1, 0.70 mmol/g) wurde die Peptidsequenz durch repetitive Anwendung der AAV 7 mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Ile, Fmoc-Cys(Far) 3, Fmoc-Lys(Alloc), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Thr(Trt) und Fmoc-Cys(StBu) verwendet. Nach dem Aufbau der

109

Zielsequenz am Harz wurden die *N*-terminale Fmoc Schutzgruppe und die Alloc Schutzgruppen der Lysin Seitenkettenfunktionalitäten nach AAV 9 entschützt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch analytische Abspaltung und die Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft. Danach wurden gleichzeitig die Trityl Schutzgruppen entfernt und das Peptid quantitativ vom polymeren Träger nach AAV 13 abgespalten sowie aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC betrug die Ausbeute 14.5 mg (7 μ mol, 7%) eines weißen Pulvers.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ /ppm: 8.76-8.68 (m, 1H, *NH* Lys), 8.48-8.35 (m, 1H, *NH* Lys), 8.23-8.14 (m, 2H, *NH* Cys, *NH* Met), 8.13-7.68 (m, 28H, 8x NH_2 , NH_2 Cys, 6x *NH* Lys, *NH* Ser, *NH* Thr, *NH* Ile, *NH* Val.), 5.23-4.93 (m, 3H, 3x $\text{CH}=\text{C}$ Far), 4.51-4.44 (m, 1H, α -*CH* Cys), 4.38-4.14 (m, 13H, 8x α -*CH* Lys, α -*CH* Ser, α -*CH* Thr, α -*CH* Val, α -*CH* Ile, α -*CH* Met), 4.11-4.01 (m, 1H, α -*CH* Cys), 4.00-3.93 (m, 1H, β -*CH* Thr), 3.63-3.53 (m, 2H, β - CH_2 Ser), 3.21-2.95 (m, 4H, β - CH_2 Cys, S-CH_2), 2.81-2.70 (m, 17H, 8x ϵ - CH_2 Lys, β - CH_{2a} Cys), 2.67-2.55 (m, 1H, β - CH_{2b} Cys), 2.46-2.37 (m, 2H, γ - CH_2 Met), 2.07-1.78 (m, 14H, 2x CH_2 - CH_2 Far, β - CH_2 Met, β -*CH* Val, CH_3 Met), 1.76-1.22 (m, 72H, 8x β - CH_2 Lys, 8x γ - CH_2 Lys, 8x δ - CH_2 Lys, 4x CH_3 Far, $\text{S-C}(\text{CH}_3)_3$, β -*CH* Ile, γ - CH_2 Ile), 1.02 (d, $J = 5.79$ Hz, 3H, CH_3 Thr), 0.87-0.77 (m, 12H, 2x CH_3 Val, 2x CH_3 Ile).

LC-MS: 5.97 min (C18); 1037.27 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

HRMS(ESI): 1037.1491 berechnet $[\text{C}_{96}\text{H}_{183}\text{O}_{18}\text{N}_{23}\text{S}_4]$, gefunden: 1037.1499 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

$[\alpha]^{20} = -41.2^\circ$ (H_2O , $c = 0.25$)

6.5 Versuche zu Kapitel 4.1.4 und 4.1.5

AAV 15: Synthese von K-Ras4B und seiner Analoga mittels Expressed Protein Ligaton

Die Kopplungen wurden so durchgeführt, dass 2-3 mg K-Ras4B Δ 174-Mesna bzw. K-Ras4B Δ 174-Mesna G12V mit 4.0 Äq. Peptid (ca. 1 mg) in 2 ml Lösung umgesetzt wurden. Zunächst wurde die entsprechende Menge Peptid in Puffer (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mesna, pH 8.5) bei Raumtemperatur durch Zusatz von 5 mM TCEP entschützt. Nach 5 min Inkubation wurde die entsprechende Menge Protein hinzugegeben. Die Kupplung erfolgt bei 4 °C für 3 h.

AAV 16: Aufarbeitung lipidierter polybasischer Proteine

Das Kupplungsprodukt wurde durch Kationenaustausch-Chromatographie isoliert. Typischerweise wurde dazu der Reaktionsansatz zunächst umgepuffert. Er wird 1:1 mit KA-Puffer (25 mM NaAc, 1 mM MgCl₂, pH 5.4) verdünnt, in eine Dialysekammer (Slide-a-Lyzer 10K, Pierce) gefüllt und über Nacht gegen Puffer KA-Puffer dialysiert. Die Reinigung erfolgte mit einer Hi-Trap SP-XL (1 ml, GE Healthcare). Die Säule wurde mit Puffer KA-Puffer (25 mM NaAc, 1 mM MgCl₂, pH 6.3) equilibriert, die Proteinlösung aufgetragen und mit 10 Säulenvolumen KA-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit Hochsalzpuffer (25 mM NaAc, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 6.3). Proteinhaltige Fraktionen wurden durch Mini-Bradford-Test identifiziert und vereinigt. Die Proteinlösung wurde durch eine Hi-Trap Desalting (5 ml, GE Healthcare) umgepuffert (20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTE, pH 7.5).

Durch Ultrafiltration wurden die Proteinlösungen konzentriert. Dies erfolgte in Ultrafiltrationseinheiten (Milipore/Biomax, 10kDa MWCO) bei 4000 rpm bei 4 °C. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Test bestimmt, das Protein aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Es wurde mittels SDS-PAGE und MALDI charakterisiert.

K-Ras4B 15

Zu 2 ml einer Pufferlösung (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mesna, pH 8.5) wurden 1.0 mg (0.57 µM, 4 Äq.) K-Ras4B Peptid **8** gegeben und nach AAV **15** entschützt und mit 3.0 mg (0.14 µM) K-Ras4BΔ174-Mesna ligiert. Die Ligation wurde nach AAV **16** aufgearbeitet und man erhielt 2.3 mg (0.11 µM, 75%) K-Ras4B **15**.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21402.3$; $m/z_{\text{obs}} = 21401.0$ [M+H]⁺

K-Ras4B S181E 16

Zu 2 ml einer Pufferlösung (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mesna, pH 8.5) wurden 1.0 mg (0.57 µM, 4 Äq.) K-Ras4B Peptid **10** gegeben und nach AAV **15** entschützt und mit 3.0 mg (0.14 µM) K-Ras4BΔ174-Mesna ligiert. Die Ligation wurde nach AAV **16** aufgearbeitet und man erhielt 0.95 mg (0.04 µM, 31%) K-Ras4B S181E **16**.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21444.3$; $m/z_{\text{obs}} = 21435.4$ [M+H]⁺

K-Ras4B-OH 19

Zu 2 ml einer Pufferlösung (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mesna, pH 8.5) wurden 1.0 mg (0.57 µM, 4 Äq.) K-Ras4B Peptid **13** gegeben und nach AAV **15** entschützt und mit 3.0 mg (0.14 µM) K-Ras4BΔ174-Mesna ligiert. Die Ligation wurde nach AAV **16** aufgearbeitet und man erhielt 1.0 mg (0.05 µM, 35%) K-Ras4B **19**.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21388.3$; $m/z_{\text{obs}} = 21386.0$ [M+H]⁺

K-Ras4B 20 (nicht farnesyliert)

Zu 2 ml einer Pufferlösung (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mesna, pH 8.5) wurden 0.87 mg (0.57 µM, 4 Äq.) K-Ras4B Peptid **11** gegeben und nach AAV **15** entschützt und mit 3.0 mg (0.14 µM) K-Ras4BΔ174-Mesna ligiert. Die Ligation wurde nach AAV **16** aufgearbeitet und man erhielt 1.5 mg (0.07 µM, 50%) K-Ras4B **20**.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21180.3$; $m/z_{\text{obs}} = 21185.6$ [M+H]⁺

K-Ras4B 21 (Dansyl-modifiziert)

Zu 2 ml einer Pufferlösung (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mesna, pH 8.5) wurden 1.2 mg (0.57 µM, 4 Äq.) K-Ras4B Peptid **12** gegeben und nach AAV **15** entschützt und mit 3.0 mg (0.14 µM) K-Ras4BΔ174-Mesna ligiert. Die Ligation wurde nach AAV **16** aufgearbeitet und man erhielt 1.3 mg (0.06 µM, 45%) K-Ras4B **21**.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21762.3$; $m/z_{\text{obs}} = 21770.2$ [M+H]⁺

K-Ras4B-CVIM 18

Zu 2 ml einer Pufferlösung (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mesna, pH 8.5) wurden 1.2 mg (0.57 µM, 4 Äq.) K-Ras4B Peptid **12** gegeben und nach AAV **15** entschützt und mit 3.0 mg (0.14 µM) K-Ras4BΔ174-Mesna ligiert. Die

Ligation wurde nach AAV 16 aufgearbeitet und man erhielt 0.9 mg (0.04 μ M, 30%) K-Ras4B-CVIM 18.

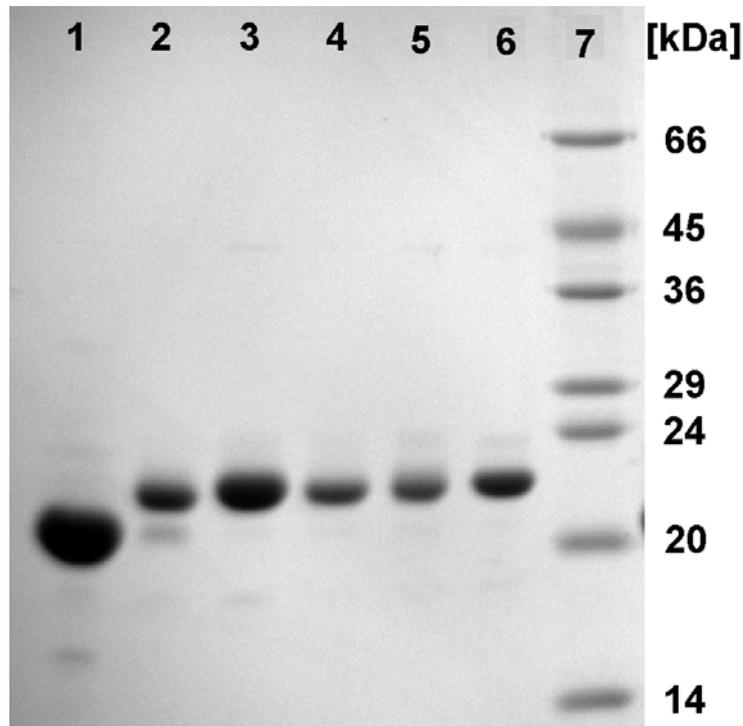


Abbildung 53: SDS-Gel Analyse der K-Ras4B Proteine nach Expressed Protein Ligation und Aufarbeitung. 1: K-Ras4B Δ 174-Mesna; 2: K-Ras4B 15; 3: K-Ras4B-OH 19; 4: K-Ras4B 21 (Dansyl-modifiziert); 5: K-Ras4B S181E 16; 6: K-Ras4B 20 (nicht farnesyliert); 7: SDS-Marker.

6.6 Versuche zu Kapitel 4.2

Synthese von S-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-lysyl-(S-farnesyl)-L-cystein-methylester 23

[Cys(StBu)-Lys-Cys(Far)-OMe]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotryl-Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) nach AAV 5 C-terminal entschützt und die an der festen Phase immobilisierte Carbonsäure nach AAV 6 mit Cys(Far)-OMe 2 unter Knüpfung einer Amidbindung derivatisiert. Die vollständige Entschütung und Kupplung wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft.

LC-MS: Fmoc-Lys-OH: 6.66 min (C4) ; 369.01 [M+H]⁺

Fmoc-Lys-Cys(Far)-OMe: 8.83 min (C4) ; 690.09 [M+H]⁺

Die Peptidsequenz wurde durch Anwendung der AAV **8** synthetisiert. Dafür wurde Fmoc-Cys(StBu) verwendet. Nach dem Aufbau der Zielsequenz am Harz wurden die N-terminale Fmoc Schutzgruppe durch dreimaliges Behandeln mit DMF/Piperidin/DBU 96:2:2 für jeweils 10 min abgespalten. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF und DCM wurde der polymere Träger über Nacht am Hochvakuum getrocknet, dann das Peptid quantitativ vom polymeren Träger nach AAV **13** abgespalten und aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC betrug die Ausbeute 14.5 mg (22 µmol, 22%) eines weißen Pulvers.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.76 (d, *J* = 8.09 Hz, 1H, NH Lys), 8.55 (d, *J* = 7.52 Hz, 1H, NH Cys(Far)OMe), 8.32, 7.95 (2x bs, 2H, NH₂ Lys, NH₂ Cys), 5.16 (t, *J* = 7.22 Hz, 1H, CH=C Far), 5.11-5.04 (m, 2H, 2x CH=C Far), 4.50-4.39 (m, 2H, α-CH Lys, α-CH Cys(Far)OMe), 4.07 (t, *J* = 6.11, 6.11 Hz, 1H, α-CH Cys), 3.64 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.25-3.04 (m, 4H, S-CH₂- Far, β-CH₂ Cys), 2.82 (dd, *J* = 13.67, 5.18 Hz, 1H, β-CH₂ Cys(Far)OMe), 2.79-2.73 (m, 2H, ε-CH₂ Lys), 2.69 (dd, *J* = 13.78, 8.59 Hz, 1H, β-CH₂ Cys(Far)OMe), 2.13-1.89 (m, 8H, 2x CH₂-CH₂ Far), 1.73-1.66 (m, 2H, β-CH₂ Lys), 1.65-1.62 (m, 6H, 2x -CH₃ Far), 1.58-1.55 (m, 6H, 2x -CH₃ Far), 1.55-1.52 (m, 2H, δ-CH₂ Lys), 1.40-1.33 (m, 2H, γ-CH₂ Lys), 1.30 (s, 9H, S-C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 170.8, 170.7 (CONHR Lys, CO₂CH₃ Cys(Far)OMe) 166.5 (CONHR Cys), 138.6 (HC=C, Far), 134.5 (HC=C, Far), 130.5 (HC=C, Far), 123.9(HC=C, Far), 123.5 (HC=C, Far), 119.9 (HC=C, Far), 51.9, 51.7, 51.9 (3x α-CH Lys, Cys, Cys(Far)OMe), 51.6 (CO₂CH₃), 47.9 (S-C(CH₃)₃), 41.4 (β-CH₂ Cys), 38.9 (2x CH₂-CH₂ Far), 38.6 (ε-CH₂ Lys), 31.8 (β-CH₂ Lys), 31.5 (β-CH₂ Cys(Far)OMe), 29.3 (S-C(CH₃)₃), 28.8 (S-CH₂- Far), 26.6 (δ-CH₂ Lys), 26.1 (CH₂-CH₂ Far), 25.8 (CH₂-CH₂ Far), 25.4 (-CH₃ Far), 21.5 (γ-CH₂ Lys), 17.2, 15.4, 15.4 (3x -CH₃ Far).

LC-MS: 7.55 min (C4); 659.14 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 659.36929 berechnet [C₃₂H₅₉N₄O₄S₃], gefunden: 659.36897 [M+H]⁺

[α]²⁰ = -5.3° (H₂O, c = 1.7)

Synthese von S-tert-Butylthio-L-cysteyl-L-methionyl-L-seryl-(S-tert-Butylthio)-L-cysteyl-L-lysyl-(S-farnesyl)-L-cystein-methylester **24**
[Cys(StBu)-Met-Ser-Cys-Lys-Cys(Far)-OMe]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotryl-Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) nach AAV 5 C-terminal entschützt und die an der festen Phase immobilisierte Carbonsäure nach AAV 6 mit Cys(Far)-OMe 2 unter Knüpfung einer Amidbindung derivatisiert. Die vollständige Entschütung und Kupplung wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft.

LC-MS: Fmoc-Lys-OH: 6.66 min (C4) ; 369.01 [M+H]⁺
 Fmoc-Lys-Cys(Far)-OMe: 8.83 min (C4) ; 690.09 [M+H]⁺

Die Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV 8 mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Ser(Trt), FmocMet und Fmoc-Cys(StBu) verwendet. Nach dem Aufbau der Zielsequenz am Harz wurden die N-terminale Fmoc Schutzgruppe durch dreimaliges Behandeln mit DMF/Piperidin/DBU 96:2:2 für jeweils 10 min abgespalten. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF und DCM wurde der polymere Träger über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Das Peptid wurde dann quantitativ vom polymeren Träger nach AAV 13 abgespalten und aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC betrug die Ausbeute 9.6 mg (9 µmol, 9%) eines weißen Pulvers.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.78 (d, *J* = 7.39 Hz, 1H, NH Met), 8.47-8.28 (m, 4H, NH₂ Cys, 2x NH Cys), 8.16 (d, *J* = 6.75 Hz, 1H, NH Ser), 7.99 (d, *J* = 5.98 Hz, 1H, NH Lys), 7.80 (s, 2H, NH₂ Lys), 5.19-5.12 (m, 1H, CH=C Far), 5.11-5.03 (m, 2H, 2x CH=C Far), 4.58-4.48 (m, 2H, α-CH Met, α-CH Cys), 4.48-4.39 (m, 1H, α-CH Cys), 4.38-4.26 (m, 2H, α-CH Ser, α-CH Lys), 4.11-4.05 (m, 1H, α-CH Cys-NH₂), 3.67-3.54 (m, 5H, CO₂CH₃ Cys(Far)OMe, β-CH₂ Ser), 3.24-3.04 (m, 5H, S-CH₂ Far, β-CH₂ Cys-NH₂, β-CH Cys), 2.95 (dd, *J* = 10.61, 7.45 Hz, 1H, β-CH Cys), 2.85-2.62 (m, 4H, β-CH₂ Cys, ε-CH₂ Lys), 2.49-2.42 (m, 2H, γ-CH₂ Met), 2.11-1.74 (m, 13H, CH₃ Met, β-CH₂ Met, 2x CH₂-CH₂ Far), 1.71-1.44 (m, 16H, β-CH₂ Lys, δ-CH₂ Lys, 4x CH₃ Far), 1.35-1.19 (m, 20H, γ-CH₂ Lys, 2x S-C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 171.2, 170.8, 170.0, 169.9, 169.1, 166.4 (3x CONH Cys, Met, Ser, Lys), 138.6 (CH=C, Far), 134.4 (CH=C, Far), 130.5 (CH=C, Far), 123.9 (CH=C, Far), 123.5 (CH=C, Far), 119.9 (CH=C, Far), 61.5 (β-CH₂ Ser), 54.6 (α-CH Ser), 52.3, 52.0, 52.0, 51.9, 51.9, 51.5 (3x α-CH Cys,), 47.9, 47.5 (2x S-C(CH₃)₃), 42.2, 40.9, 39.1, 38.6 (2x β-CH₂ Cys, ε-CH₂ Lys, 2x CH₂-CH₂ Far), 29.4, 29.3, (2x S-C(CH₃)₃), 32.4, 32.4, 31.4, 29.1, 28.7, 26.4, 26.0, 25.7, 25.3, 21.9, (β-CH₂ Met, γ-CH₂ Met, β-CH₂ Lys, γ-CH₂ Lys, δ-CH₂ Lys, S-CH₂ Far, β-CH₂ Cys(Far)OMe, 2x

CH₂-CH₂ Far, CH₃ Far), 17.4 (CH₃ Far), 15.7 (CH₃ Far), 15.6 (CH₃ Far), 14.4 (CH₃ Met).

LC-MS: 7.37 min (C4); 1068.16 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 1068.48566 berechnet [C₄₇H₈₆O₈N₇S₆], gefunden: 1068.48651 [M+H]⁺

[α]_D²⁰ = -28.2° (MeOH, c = 1.0)

Synthese des H-Ras Proteins 25 mittels Expressed Protein Ligation

Für die Ligation von H-Ras **25** wurden 3.5 mg (0.16 µM) H-RasΔ183-Mesna mit 1.1 mg (1.44 µM, 9 Äq.) H-Ras Tripeptid **23** in 3.5 ml Lösung umgesetzt. Das Peptid wurde 5 min bei Raumtemperatur in Carbonatpuffer (100 mM NaH₂CO₃, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mesna, 5 mM TCEP, pH 9.0) entschützt. Die gewünschte Proteinmenge wurde in IPL-Puffer (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mesna, pH 8.5) mit 5 mM TCEP vorgelegt und mit dem entschützten Peptid vereinigt. Die Kupplung erfolgte bei Raumtemperatur für 3 h.

Der präparative Kupplungsansatz wurde mit 1 ml Tritonpuffer (11% (w/v) Triton X-114, 30 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4) versetzt, durch Invertieren vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Detergenschlössung wurde für 3 min auf 37°C erwärmt und anschließend 5 min bei 3800 rpm bei 30 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und noch zweimal mit je 1 ml Tritonpuffer extrahiert. Danach wurden die Tritonphasen vereinigt, mit 10 ml DEAE-Puffer A (20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE, pH 7.4) versetzt und reextrahiert.

Durch einen DEAE-Anionenaustaucher wurde das Detergens entfernt. Die gewaschenen Tritonphasen wurden mit 9 Volumen Puffer A (20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE, pH 7.4) versetzt. Die DEAE-Säule (30 ml, GE Healthcare) wurde mit 5 Volumen Puffer A äquilibriert, mit der detergenschaltigen Proteinlösung beladen und mit 500 ml Puffer A gespült. Das gebundene H-Ras **25** wurde mit DEAE-Puffer B (1000 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE, pH 7.4) eluiert. Der Anteil an Puffer B wurde über 5 Säulenvolumen von 0 auf 100% gesteigert.

Die Proteinlösung wurde durch eine Hi-Trap Desalting Säule (5 ml, GE Healthcare) umgepuffert. Dafür wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Ras-Standardpuffer (20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTE, pH 7.5) equilibriert. Danach wurde die Proteinlösung in Portionen von 1.5 ml auf die Säule gegeben. Sie wurden jeweils mit 10 ml Ras-Standardpuffer gespült. Proteinhaltige Fraktionen wurden durch Mini-Bradford-Test identifiziert und vereinigt.

Durch Ultrafiltration wurden die Proteinlösungen konzentriert. Dies erfolgte in Ultra-116

filtrationseinheiten (*Milipore/Biomax*, 10 kDa MWCO) bei 4000 rpm bei 4 °C. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Test bestimmt, das Protein aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Protein wurde mittels SDS-PAGE und MALDI charakterisiert. Es wurden 1.3 mg (0.06 µM, 40%) H-Ras **25** erhalten.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21218.3$ $m/z_{\text{obs}} = 21219.8$ [M+H]⁺

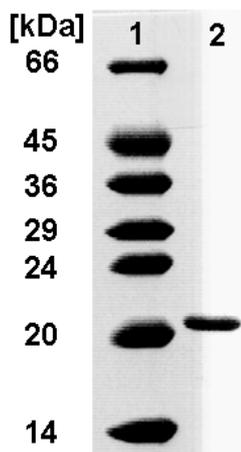


Abbildung 54: SDS-Gel Analyse von H-Ras **25** nach Expressed Protein Ligation und Aufarbeitung. 1: SDS7-Marker; 2: H-Ras **25**.

6.7 Versuche zu Kapitel 4.3

Dansyl-*N*-Glycin-*O*-*tert*-butylester **26**

Eine Lösung von 1.00 g Glycin-*tert*-butylester Hydrochlorid (5.99 mmol) in 10 ml trockenem DCM wurde mit 1.66 ml Triethylamin (11.98 mmol, 2.0 Äq.) versetzt. Danach wurden 1.77 g Dansylchlorid (6.59 mmol, 1.1 Äq.) zur Lösung hinzugegeben, die anschließend über Nacht gerührt wurde. Die orange-gelbe Lösung wurde dann sowohl dreimal mit 1 M Essigsäure als auch dreimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und anschließend mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das orange Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: EE/cHex 4:1). Die Ausbeute betrug 1.72 g (4.73 mmol, 79%) eines gelb-grünlichen Schaums.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.47-8.41 (m, 2H, NH, CH arom. Dansyl), 8.32 (d, *J* = 8.68 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.11 (dd, *J* = 7.29, 1.11 Hz, 1H, CH arom.

Dansyl), 7.58 (t, $J = 7.95$ Hz, 2H, 2x CH arom. Dansyl), 7.24 (d, $J = 7.54$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 3.64 (d, $J = 6.24$ Hz, 2H, α -CH₂), 2.80 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.11 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃ O-tBu).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 167.8 (CO₂tBu), 151.1 (C_q arom. Dansyl), 136.3 (C_q arom. Dansyl), 129.2 (C_q arom. Dansyl), 129.0 (C_q arom. Dansyl), 129.0 (CH arom. Dansyl), 127.8 (CH arom. Dansyl), 127.6 (CH arom. Dansyl), 123.3 (CH arom. Dansyl), 119.3 (CH arom. Dansyl), 114.9 (CH arom. Dansyl), 80.6 (OC(CH₃)₃), 44.9 (N(CH₃)₂), 44.4 (α -CH₂), 27.1 (CO₂C(CH₃)₃).

R_F-Wert: 0.13 (EE/cHex 4:1)

LC-MS: 9.47 min (C4); 365.04 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 365.15295 berechnet [C₁₈H₂₅N₂O₄S], gefunden: 365.15283 [M+H]⁺

Dansyl-*N*-Glycin 27

Eine Lösung von 1.50 g Dansyl-*N*-Glycin-*O*-*tert*-butyl-ester **26** (4.10 mmol) in 20 ml DCM/TFA (1:1) wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Toluol coevaporiert und säulenchromatographisch an Kieselgel aufgetrennt (Laufmittel: EE → EE/(AcOH/EE/H₂O/MeOH 3:3:2:3) 95:5). Die Ausbeute betrug 1.02 g (3.32 mmol, 81%) eines grünlichen Schaums.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 8.45 (d, $J = 8.48$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.29 (d, $J = 8.66$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.11 (dd, $J = 7.30, 1.15$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.59 (dd, $J = 15.15, 7.39$ Hz, 2H, 2x CH arom. Dansyl), 7.25 (d, $J = 7.48$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 3.58 (s, 2H, α -CH₂), 2.82 (s, 6H, N(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*D*₆) δ /ppm: 170.2 (CO₂H), 151.1 (C_q arom. Dansyl), 136.2 (C_q arom. Dansyl), 129.2 (C_q arom. Dansyl), 129.0 (C_q arom. Dansyl), 128.9 (CH arom. Dansyl), 127.7 (CH arom. Dansyl), 127.6 (CH arom. Dansyl), 123.3 (CH arom. Dansyl), 119.2 (CH arom. Dansyl), 114.9 (CH arom. Dansyl), 44.9 (N(CH₃)₂), 43.8 (α -CH₂).

R_F-Wert: 0.43 (EE/(AcOH/EE/H₂O/MeOH 3:3:2:3) 95:5)

LC-MS: 6.29 min (C4); 308.96 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 309.0904 berechnet [C₁₄H₁₆N₂O₄S+H], gefunden: 309.0904 [M+H]⁺

3-(2-(2-(3-(Tritylamino)propoxy)ethoxy)ethoxy)propan)-1-amid-dansyl 28
[Trt-NH-(PEG)₂-NH-Dansyl]

Eine Lösung von 1.00 g 3-(2-(2-(3-(Tritylamino)propoxy)ethoxy)ethoxy)propan)-1-amin (2.16 mmol) in 10 ml trockenem DCM wurde mit 0.59 ml trockenem Triethylamin (4.32 mmol, 2.0 Äq.) und 0.63 g Dansylchlorid (2.38 mmol, 1.1 Äq.) versetzt. Danach wurde über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel der orange-gelben Reaktionslösung wurde unter vermindertem Druck entfernt und das orange Rohprodukt säulenchromatographisch aufgetrennt (Laufmittel: PE → PE/EE 1:1). Die Ausbeute betrug 1.13 g (1.62 mmol, 75%) eines gelb-grünlichen Schaums.

¹H-NMR (400 MHz, *CDCl*₃) δ/ppm: (d, *J* = 8.50 Hz, 1H, *CH* arom. Dansyl), 8.34 (d, *J* = 8.65 Hz, 1H, *CH* arom. Dansyl), 8.25 (dd, *J* = 7.28, 1.24 Hz, 1H, *CH* arom. Dansyl), 7.60-7.44 (m, 8H, 2x *CH* arom. Dansyl, 6x *CH* arom. Trityl), 7.29-7.22 (m, 6H, 6x *CH* arom. Trityl), 7.19-7.14 (m, 4H, 1x *CH* arom. Dansyl, 3x *CH* arom. Trityl), 5.70 (t, *J* = 5.77, 5.77 Hz, 1H, *NH-SO*₂), 3.65-3.52 (m, 8H, 2x *O-CH*₂-*CH*₂-*O*), 3.42-3.37 (m, 4H, 2x *CH*₂-*CH*₂-*CH*₂-*O*), 3.03 (dd, *J* = 12.02, 5.93 Hz, 2H, *CH*₂-*NH-SO*₂), 2.88 (s, 6H, *N(CH*₃)₂), 2.23 (t, *J* = 6.57 Hz, 2H, *CH*₂-*NH-Trt*), 1.85-1.80 (m, 1H, *NH-Trt*), 1.77 (d, *J* = 6.46 Hz, 2H, *CH*₂-*CH*₂-*NH-SO*₂), 1.66-1.59 (m, 2H, *CH*₂-*CH*₂-*NH-Trt*).

¹³C-NMR (100.5 MHz, *CDCl*₃) δ/ppm: 151.9 (*C*_q arom. Dansyl), 146.2 (*C*_q arom. Trityl), 135.0 (*C*_q arom. Dansyl), 130.1 (*C*_q arom. Dansyl), 129.9 (*C*_q arom. Dansyl), 129.7 (*CH* arom. Dansyl), 129.5 (*CH* arom. Dansyl), 128.6 (*CH* arom. Trityl), 128.1 (*CH* arom. Dansyl), 127.6 (*CH* arom. Trityl), 126.1 (*CH* arom. Trityl), 123.1 (*CH* arom. Dansyl), 119.1 (*CH* arom. Dansyl), 115.0 (*CH* arom. Dansyl), 70.8 (*NH-C*(*C*₆*H*₅)₃), 70.6 (*CH*₂-*CH*₂-*O*), 70.4 (*CH*₂-*CH*₂-*O*), 70.2 (*CH*₂-*CH*₂-*O*), 70.0 (*CH*₂-*CH*₂-*O*), 70.0 (*CH*₂-*CH*₂-*O*), 69.8 (*CH*₂-*CH*₂-*O*), 45.4(*N(CH*₃)₂), 42.1 (-*CH*₂-*NH-Trt*), 41.0 (-*CH*₂-*NH-SO*₂-), 30.5 (*O-CH*₂-*CH*₂-*CH*₂-*NH-SO*₂-), 28.6 (*O-CH*₂-*CH*₂-*CH*₂-*NH-Trt*).

R_f-Wert: 0.47 (PE/EE 1:1)

LC-MS: 8.50 min (C4); 695.99 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 696.34657 berechnet [C₄₁H₅₀N₃O₅S], gefunden: 696.34367 [M+H]⁺

3-(3-(2-(2-(3-(Dansylamido)propoxy)ethoxy)ethoxy)propylcarbonsäureamid)-propionsäure 29
[Dansyl-NH-(PEG)₂-NHCO-C₂H₄-COOH]

Eine Lösung von 1.00 g Trt-NH-(PEG)₂-NH-Dansyl **28** (1.44 mmol) in 10 ml DCM/TFA (9:1) wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde mit Toluol unter vermindertem Druck coevaporiert und im Hochvakuum getrocknet. Danach wurde der Rückstand in trockenem DCM gelöst und mit 0.33 g Bernsteinsäureanhydrid (3.31 mmol, 2.3 eq) und 0.42 g DMAP (3.46 mmol, 2.4 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Reaktionsgemisch säulenchromatographisch an Kieselgel aufgetrennt (Laufmittel: DCM → DCM/MeOH 9:1). Die Ausbeute betrug 0.43 g (0.73 mmol, 51%) eines gelben Öls.

¹H-NMR (400 MHz, DMF-d₇/CDCl₃, 1:10) δ/ppm: 8.46 (d, *J* = 8.40 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.29 (d, *J* = 8.60 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.14 (d, *J* = 7.11 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.47 (dd, *J* = 16.79, 8.72 Hz, 2H, 2x CH arom. Dansyl), 7.17 (d, *J* = 7.53 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.10 (bs, 1H, NH), 6.32 (bs, 1H, NH), 3.62-3.12 (m, 14H, 2x O-CH₂-CH₂-O, 2x CH₂-CH₂-CH₂-O, CH₂-CH₂-CH₂-NHCO-), 2.99-2.89 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-NHSO₂-), 2.85 (s, 6H, N(CH₃)₃), 2.58-2.33 (m, 4H, -CONH-CH₂-CH₂-CONH-), 1.68-1.52 (m, 4H, 2x O-CH₂-CH₂-CH₂-N).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMF-d₇/CDCl₃, 1:10) δ/ppm: 176.3 (COOH), 172.9 (CONH), 150.5 (C_q arom. Dansyl), 134.9 (C_q arom. Dansyl), 129.6 (C_q arom. Dansyl), 129.4 (CH arom. Dansyl), 129.3 (CH arom. Dansyl), 129.1 (C_q arom. Dansyl), 127.9 (CH arom. Dansyl), 123.3 (CH arom. Dansyl), 119.6 (CH arom. Dansyl), 115.3 (CH arom. Dansyl), 69.9, 69.7, 69.3, 69.3, 68.9, 68.9 (4x O-CH₂-CH₂-O, 2x CH₂-CH₂-CH₂-O), 45.2 (N(CH₃)₃), 41.0 (CH₂-CH₂-CH₂-NHSO₂-), 36.9 (CH₂-CH₂-CH₂-NHCO-), 30.4, 29.7 (CONH-CH₂-CH₂-CONH), 28.5, 28.4 (2x O-CH₂-CH₂-CH₂-NH).

R_F-Wert: 0.35 (DCM/MeOH 9:1)

LC-MS: 7.44 min (C4); 544.03 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 554.25306 berechnet [C₂₆H₄₀N₃O₈S]⁺, gefunden: 554.25235 [M+H]⁺

3-(3-(2-(2-(3-(Dansylamido)propoxy)ethoxy)ethoxy)propylcarbonsäureamid)-propionsäureamid-S-farnesyl-L-cystein-methylester 30
[Dansyl-NH-(PEG)₂-NHCO-C₂H₄-CONH-Cys(Far)OMe]

Zu einer Lösung von 100 mg Dansyl-NH-(PEG)₂-NHCO-C₂H₄-COOH **29** (0.18 mmol) in 10 ml DMF wurden 61 mg Cys(Far)-OMe **2** (0.18 mmol, 1.0 Äq.), 61 µl DIPEA (0.36 mmol, 2.0 Äq.) und 111.7 mg HCTU (0.27 mmol, 1.5 Äq.) hinzugefügt. Die

Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dann das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittel DCM → DCM/MeOH 9:1). Die Ausbeute betrug 78.6 mg (0.09 mmol, 50%) eines gelben Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: (d, $J = 8.72$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.46 (d, $J = 8.73$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.26 (d, $J = 7.20$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.58 (dd, $J = 15.52$ Hz, 7.08 Hz, 2H, 2x CH arom. Dansyl), 7.32 (d, $J = 7.52$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.02 (d, $J = 7.37$ Hz, 1H, NH Cys(Far)OMe), 6.74 (s, 1H, NHCO), 6.12 (s, 1H, N HSO_2), 5.18 (t, $J = 7.78$ Hz, 1H, CH=C Far), 5.08 (t, $J = 6.69$ Hz, 2H, 2x CH=C Far), 4.72 (dd, $J = 12.90$, 6.72 Hz, 1H, α -CH), 3.72 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.69-3.59 (m, 6H, 2x O- CH_2 - CH_2 -O), 3.53 (t, $J = 5.67$ Hz, 2H, CONH- CH_2 - CH_2 - CH_2 -O), 3.51-3.47 (m, 2H, O- CH_2 - CH_2 -O), 3.43 (t, $J = 5.57$ Hz, 2H, O- CH_2 - CH_2 - CH_2 -N HSO_2), 3.32 (q, $J = 6.02$ Hz, 2H, CH_2 - CH_2 - CH_2 -NHCO-), 3.14 (ddd, $J = 20.66$, 13.22, 7.87 Hz, 2H, S- CH_2 Far), 3.01 (s, 8H, N(CH_3) $_3$, CH_2 - CH_2 - CH_2 -N HSO_2 -), 2.87 (ddd, $J = 20.74$, 14.04, 5.85 Hz, 2H, β - CH_2 Cys), 2.61-2.46 (m, 4H, -CONH- CH_2 - CH_2 -CONH-), 2.13-1.92 (m, 8H, 2x CH_2 - CH_2 Far), 1.77-1.70 (m, 2H, CH_2 - CH_2 - CH_2 -NHCO-), 1.69-1.61 (m, 8H, CH_2 - CH_2 -N HSO_2 -, 2x CH_3 Far), 1.59 (s, 6H, 2x CH_3 Far).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 172.5 (CONHR), 172.4 (CONHR), 171.3 (CO_2CH_3), 148.9 (C_q arom. Dansyl), 139.9 (HC=C, Far), 135.4 (C_q arom. Dansyl), 135.3 (HC=C, Far), 131.2 (HC=C, Far), 129.7 (C_q arom. Dansyl), 129.6 (CH arom. Dansyl), 129.2 (CH arom. Dansyl), 129.0 (C_q arom. Dansyl), 127.8 (CH arom. Dansyl), 124.2 (CH arom. Dansyl), 124.0, (HC=C Far), 123.7 (HC=C, Far), 121.1 (CH arom. Dansyl), 119.4 (HC=C, Far), 115.8 (CH arom. Dansyl), 70.5, 70., 69., 69., 69.7 (CH_2 - CH_2 -O), 69.5 (4x O- CH_2 - CH_2 -O, 2x CH_2 - CH_2 - CH_2 -O), 52.4 (α -CH), 51.9 (CO_2CH_3), 45.6 (N(CH_3) $_3$), 41.9 (CH_2 - CH_2 - CH_2 -N HSO_2 -), 39.7 (CH_2 - CH_2 Far), 39.6 (CH_2 - CH_2 Far), 37.8 (CH_2 - CH_2 - CH_2 -NHCO-), 33.0 (β - CH_2), 31.5, 31.4 (CONH- CH_2 - CH_2 -CONH), 29.8 (S- CH_2 Far), 28.7, 28.6 (2x O- CH_2 - CH_2 - CH_2 -NH), 26.6 (CH_2 - CH_2 Far), 26.4 (CH_2 - CH_2 Far), 25.6 (CH_3 Far), 17.6 (CH_3 Far), 16.0 (CH_3 Far), 15.9 (CH_3 Far).

R_f -Wert: 0.16 (DCM/MeOH 19:1)

LC-MS: 10.59 min (C4); 875.16 [M+H] $^+$

HRMS (ESI): 875.46570 berechnet [$\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{O}_9\text{N}_4\text{S}_2$], gefunden: 875.46466 [M+H] $^+$

$[\alpha]^{20} = -2.4^\circ$ (DCM, c = 1.4)

3-(3-(2-(2-(3-(Dansylamido)propoxy)ethoxy)ethoxy)propylcarbonsäureamid)-propionsäureamid-L-seryl-L-lysyl-L-threonyl-L-lysyl-(S-farnesyl)- L-cystein-methylester 31

[Dansyl-NH-(PEG)₂-NHCO-C₂H₄-CONH-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-OMe]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotriyl-Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) nach AAV 5 C-terminal entschützt und die an der festen Phase immobilisierte Carbonsäure nach AAV 6 mit Cys(Far)-OMe 2 unter Knüpfung einer Amidbindung derivatisiert. Die vollständige Entschätzung und Kupplung wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft.

LC-MS: Fmoc-Lys-OH: 6.66 min (C4) ; 369.01 [M+H]⁺
 Fmoc-Lys-Cys(Far)-OMe: 8.83 min (C4) ; 690.09 [M+H]⁺

Die Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV 8 mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Alloc), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Thr(Trt) und Dansyl-NH-(PEG)₂-NHCO-C₂H₄-COOH) 29 verwendet. Nach dem Aufbau der Zielsequenz am Harz und mehrmaligem Waschen mit DMF und DCM wurde der polymere Träger über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Danach wurden die Alloc-Schutzgruppen nach AAV 9 und die Trityl Schutzgruppen und das Peptid quantitativ vom polymeren Träger nach AAV 13 abgespalten und aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC betrug die Ausbeute 15.8 mg (12 µmol, 12%) eines weißen Pulvers.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.46 (d, *J* = 8.61 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.46 (d, *J* = 8.61 Hz, 1H), 8.39-8.27 (m, 2H, CH arom. Dansyl, NH Cys(Far)OMe), 8.17 (d, *J* = 7.38 Hz, 1H, NH Lys), 8.12-8.08 (m, 2H, NH Ser, CH arom. Dansyl), 7.92-7.66 (m, 7H, 2x NH PEG, NH Lys, 2x NH₂), 7.65-7.53 (m, 3H, NH Thr, 2x CH arom. Dansyl), 7.26-7.23 (m, 1H, CH arom. Dansyl), 5.20-5.03 (m, 3H, 3x HC=C Far), 4.49-4.19 (m, 5H, 2x α-CH Lys, α-CH Ser, α-CH Thr, α-CH Cys(Far)OMe), 3.97 (s, 1H, β-CH Thr), 3.67-3.55 (m, 5H, CO₂CH₃, β-CH₂ Ser), 3.47-3.01 (m, 16H, CONH-CH₂-CH₂-CH₂-O, , O-CH₂-CH₂-O, S-CH₂ Far), 2.85-2.79 (m, 9H, N(CH₃)₂, β-CH₂ Cys(Far)OMe, O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂SO₂), 2.79-2.70 (m, 4H, 2x ε-CH₂ Lys), 2.70-2.61 (m, 1H, β-CH₂ Cys(Far)OMe), 2.44-2.28 (m, 4H, -CONH-CH₂-CH₂-CONH-), 2.10-1.84 (m, 8H, 2x CH₂-CH₂ Far), 1.80-1.44 (m, 24H, β-CH₂ Lys, δ-CH₂ Lys, 2x O-CH₂-CH₂-CH₂-N, 4x CH₃ Far), 1.40-1.27 (m, 4H, 2x γ-CH₂ Lys), 1.01 (d, *J* = 5.58 Hz, 3H, CH₃ Thr).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 172.3, 171.6, 171.5, 171.4, 170.9, 170.5, 169.6 (6x CONH 2x Lys, Ser, Thr, NHCOCH₂CH₂CONH, COCH₃), 151.3 (C_q arom.

Dansyl), 138.7 (HC=C, Far), 135.8 (C_q arom. Dansyl), 134.5 (HC=C, Far), 130.5 (HC=C, Far), 129.9 (C_q arom. Dansyl), 129.3 (CH arom. Dansyl), 129.0 (CH arom. Dansyl), 129.0 (C_q arom. Dansyl), 128.2 (CH arom. Dansyl), 127.7 (CH arom. Dansyl), 124.0, (HC=C, Far), 123.5 (HC=C, Far), 119.9 (HC=C, Far), 119.0 (CH arom. Dansyl), 115.0 (CH arom. Dansyl), 69.6, 69.5, 69.4, 69.2 (2x O-CH₂-CH₂-O), 67.9, 67.2 (2x NH-CH₂-CH₂-CH₂-O), 66.4, (β-CH Thr), 61.4 (β-CH₂ Ser), 57.8, 55.5, 52.7, 52.0, 51.9, 51.8 (2x α-CH Lys, α-CH Cys(Far)OMe, α-CH Ser, α-CH Thr, CO₂CH₃), 45.0 (N(CH₃)₃), 39.3 (O-CH₂-CH₂-CH₂-NHSO₂), 39.1, 39.0 (2x CH₂-CH₂ Far) 38.5 (2x ε-CH₂ Lys), 35.7 (O-CH₂-CH₂-CH₂-NHCO), 31.3 (β-CH₂ Cys(Far)OMe), 30.7 30.6, 30.5, 30.4 (-CONH-CH₂-CH₂-CONH-, 2x β-CH₂ Lys), 29.2, 29.1, 26.5, 26.4 (2x O-CH₂-CH₂-CH₂-NH-, δ-CH₂ Lys), 26.1 25.6 (2x CH₂-CH₂ Far), 25.4 (CH₃ Far), 22.3, 22.1 (2x γ-CH₂ Lys), 19.2 (CH₃ Thr), 17.4, 15.7, 15.6 (3x CH₃ Far).

LC-MS: 7.43 min (C4); 1319.58 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 1319.7353 berechnet [C₆₄H₁₀₇N₁₀O₁₅S₂]⁺, gefunden: 1319.7356 [M+H]⁺
 [α]²⁰ = -10.8° (MeOH, c = 0.5)

Dansyl-glycyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-L-lysyl-L-threonyl-L-lysyl-(S-farnesyl)- L-cystein-methylester 3

[Dansyl-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Ser-Lys-Thr-Lys-Cys(Far)-OMe]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotryl-Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) nach AAV 5 C-terminal entschützt und die an der festen Phase immobilisierte Carbonsäure nach AAV 6 mit Cys(Far)-OMe 2 unter Knüpfung einer Amidbindung derivatisiert. Die vollständige Entschätzung und Kupplung wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft.

LC-MS: Fmoc-Lys-OH: 6.66 min (C4) ; 369.01 [M+H]⁺

Fmoc-Lys-Cys(Far)-OMe: 8.83 min (C4) ; 690.09 [M+H]⁺

Die Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV 8 mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Alloc), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Thr(Trt) und Dansyl-Gly \$1 verwendet. Nach dem Aufbau der Zielsequenz am Harz wurden die Alloc Schutzgruppen der Lysin Seitenkettenfunktionalitäten nach AAV 9 entschützt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft. Danach wurden gleichzeitig die Trityl Schutzgruppen entfernt und das Peptid quantitativ vom

polymeren Träger nach AAV **13** abgespalten sowie aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC betrug die Ausbeute 12.1 mg (6.5 μ mol, 7%) eines weißen Pulvers.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ /ppm: 8.64-8.54 (m, 1H, -NH- Lys), 8.47 (d, $J = 8.42$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.45-8.39 (m, 2H, -NH- Lys, -NH- Cys), 8.34-8.30 (m, 1H, -NH- Gly), 8.28 (d, $J = 8.69$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.11 (d, $J = 7.23$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.10-7.67 (m, 24H, -NH- Ser, -NH- Thr, 6x -NH- Lys, 8x -NH₂ Lys), 7.64-7.56 (m, 2H, CH arom. Dansyl), 7.26 (d, $J = 7.54$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 5.23-5.01 (m, 3H, 3x CH=C, Far), 4.55-4.17 (m, 11H, 8x α -CH Lys, α -CH Cys, α -CH Ser, α -CH Thr), 4.01-3.93 (m, 1H, β -CH Thr), 3.66-3.49 (m, 7H, (-CO₂CH₃ Cys(Far)OMe), α -CH₂ Gly, β -CH₂ Ser), 3.23-3.08 (m, 2H, -S-CH₂- Far), 3.03-2.87 (m, 2H, β -CH₂ Cys), 2.83 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.79-2.71 (m, 16H, 8x ϵ -CH₂ Lys), 2.11-1.82 (m, 8H, 2x CH₂-CH₂ Far), 1.76-1.00 (m, 63H, 8x β -CH₂ Lys, 8x γ -CH₂ Lys, 8x δ -CH₂ Lys, 4x -CH₃ Far, -CH₃ Thr).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ /ppm: 172.5-171.2, 171.0-170.9, 170.0, 169.5, 168.0 (CONHR, 8x Lys, Cys, Ser, Thr, Gly, CO₂CH₃ Cys(Far)), 151.4 (C_q arom. Dansyl) 138.8 (HC=C, Far), 136.5 (HC=C, Far), 135.1 (HC=C, Far), 131.3 (C_q arom. Dansyl), 130.3 (C_q arom. Dansyl), 129.4 (C_q arom. Dansyl), 127.8 (CH arom. Dansyl), 127.5 (CH arom. Dansyl), 126.5 (HC=C, Far), 123.4 (HC=C, Far-), 123.1 (CH arom. Dansyl), 119.5 (CH arom. Dansyl), 118.8 (CH arom. Dansyl), 114.7 (CH arom. Dansyl), 66.7 (β -CH Thr), 61.8 (β -CH₂ Ser), 57.7 (α -CH Thr), 54.9, 52.7-51.8 (8x α -CH Lys, α -CH Cys, α -CH Ser, α -CH Gly) 51.5 (-CO₂CH₃ Cys(Far)OMe), 45.1 (α -CH Gly), 44.6 (-N(CH₃)₂), 39.0 (2x CH₂-CH₂ Far), 38.4 (8x ϵ -CH₂ Lys), 31.1 (β -CH₂ Cys(Far)OMe), 31.7-31.1 (8x β -CH₂ Lys), 28.3 (S-CH₂ Far), 26.5 (8x δ -CH₂ Lys), 25.8 (2x CH₂-CH₂ Far), 25.1 (CH₃ Far), 21.8 (8x γ -CH₂ Lys), 19.1 (CH₃ Thr), 19.0 (CH₃ Far), 15.7 (2x CH₃ Far).

LC-MS: 4.31 min (C18) ; 1842.83 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 461.54106 berechnet [C₈₈H₁₅₉O₁₇N₂₁S₂], gefunden: 461.54071 [M+4H]⁴⁺

$[\alpha]^{20} = -29.6^\circ$ (H₂O, c = 0.23)

Synthese von 3-(3-(2-(2-(3-(Dansylamido)propoxy)ethoxy)ethoxy)propylcarbon-säureamid)propionsäureamid-(S-tert-Butylthio)-L-cysteyl-L-methionyl-L-seryl-(S-tert-Butylthio)-L-cysteyl-L-lysyl-(S-farnesyl)-L-cystein-methylester 33

[Dansyl-NH-(PEG)₂-NHCO-C₂H₄-CONH-Cys(StBu)-Met-Ser-Cys(StBu)-Lys-Cys(Far)-OMe]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotryl-Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) nach AAV 5 C-terminal entschützt und die an der festen Phase immobilisierte Carbonsäure nach AAV 6 mit Cys(Far)-OMe 2 unter Knüpfung einer Amidbindung derivatisiert. Die vollständige Entschätzung und Kupplung wurde durch analytische Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV 11 überprüft.

LC-MS: Fmoc-Lys-OH: 6.66 min (C4) ; 369.01 [M+H]⁺
Fmoc-Lys-Cys(Far)-OMe: 8.83 min (C4) ; 690.09 [M+H]⁺

Die Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV 8 mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Ser(Trt), FmocMet, Fmoc-Cys(StBu) und Dansyl-NH-(PEG)₂-NHCO-C₂H₄-COOH) 29 verwendet. Nach dem Aufbau der Zielsequenz am Harz wurde nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF und DCM der polymere Träger über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Das Peptid wurde dann quantitativ vom polymeren Träger nach AAV 13 abgespalten und aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC betrug die Ausbeute 9.6 mg (6 µmol, 6%) eines weißen Pulvers.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.46 (d, *J* = 8.24 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.37 (d, *J* = 6.50 Hz, 1H, NH Cys), 8.34-8.27 (m, 2H, CH arom. Dansyl, NH Cys), 8.20-8.13 (m, 2H, NH Cys, NH Met), 8.10 (d, *J* = 7.10 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.99-7.91 (m, 1H, NH Lys), 7.88 (t, *J* = 6.27, 6.27 Hz, 1H, NH PEG), 7.85-7.79 (m, 2H, NH PEG, NH Ser), 7.70 (bs, 2H, NH₂ Lys), 7.65-7.55 (m, 2H, 2x CH arom. Dansyl), 7.50-7.43 (m, 1H, CH arom. Dansyl), 5.21-5.11 (m, 1H, CH=C Far), 5.11-5.04 (m, 2H, 2x CH=C Far), 5.03-4.99 (m, 1H, OH), 4.55-4.39 (m, 3H, 3x α-CH Cys), 4.39-4.25 (m, 3H, α-CH Ser, α-CH Lys, α-CH Met), 3.66-3.55 (m, 5H, COCH₃, β-CH₂ Ser), 3.46-2.90 (m, 22H, 6x CH₂-O PEG, 2x CH₂-N PEG, 2x β-CH₂ Cys, S-CH₂ Far), 2.88-2.60 (m, 10H, N(CH₃)₃, β-CH₂ Cys, ε-CH₂ Lys), 2.46-2.29 (m, 6H, CONH-CH₂-CH₂-CONH, γ-CH₂ Met), 2.13-1.80 (m, 13H, 2x CH₂-CH₂ Far, β-CH₂ Met, CH₃ Met), 1.76-1.42 (m, 20H, 4x CH₃ Far, 2x CH₂ PEG, β-CH₂ Lys, δ-CH₂ Lys), 1.35-1.17 (m, 20H, 2x S-C(CH₃)₃, γ-CH₂ Lys).

LC-MS: 9.64 min (C4); 1603.45 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 1603.7209 berechnet [C₇₃H₁₂₃O₁₅N₁₀S₇], gefunden: 1603.7209 [M+H]⁺

[α]_D²⁰ = -12.7° (MeOH, c = 0.86)

Synthese von 3-(3-(2-(2-(3-(Dansylamido)propoxy)ethoxy)ethoxy)propylcarbon-säureamid)propionsäureamid-glycyl-(S-tert-Butylthio)-L-cysteyl-L-methionyl-glycyl-L-leucyl-L-prolyl-(S-farnesyl)-L-cystein-methylester 34
[Dansyl-NH-(PEG)₂-NHCO-C₂H₄-CONH-Gly-Cys(StBu)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe]

Die Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV **8** an 192 mg eines 4-Fmoc-hydrazinobenzoyl *NovaGel* Harzes mit vorangestellter Fmoc-Entschützung aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Cys(Far) **3**, Fmoc-Pro, Fmoc-Leu, Fmoc-Met, Fmoc-Gly, Fmoc-Cys(StBu) und Dansyl-NH-(PEG)₂-NHCO-C₂H₄-COOH **29** verwendet. Für die Synthese wurden alle Lösungsmittel vorher entgast. Zur Abspaltung wurde der polymere Träger in einer Sauerstoffatmosphäre für 3 h bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 7.4 mg Cu(OAc)₂ (0.041 mmol, 0.05 Äq.) und 66 µL Pyridin (0.818 mmol, 1.00 eq) in MeOH/THF 1:1 geschüttelt. Danach wurde das Harz mit DCM, MeOH und DCM/MeOH gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in 1.5 ml MeOH gelöst und durch präparative HPLC aufgetrennt. Die Ausbeute betrug 7.6 mg (5 µmol, 5%) eines gelben Öls.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.46 (d, *J* = 8.45 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.39-8.33 (m, 1H, NH Gly), 8.32-8.25 (m, 2H, CH arom. Dansyl, NH Cys), 8.19 (d, *J* = 6.73 Hz, 1H NH Cys), 8.09 (d, *J* = 6.27 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.00-7.87 (m, 4H, NH Leu, NH Pro, NH Met, NH PEG), 7.82 (t, *J* = 4.63 Hz, 1H NH PEG), 7.66-7.56 (m, 2H, 2x CH arom. Dansyl), 7.25 (d, *J* = 6.38 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 5.16 (t, *J* = 7.55 Hz, 1H, CH=C Far), 5.11-5.03 (m, 2H, 2x CH=C Far), 4.57 (dd, *J* = 13.64, 6.99 Hz, 1H, α-CH Leu), 4.52-4.44 (m, 1H, α-CH Cys), 4.43-4.32 (m, 2H, α-CH Cys, α-CH Pro), 4.27 (dd, *J* = 13.75, 7.23 Hz, 1H, α-CH Met), 3.76-3.58 (m, 6H, α-CH₂ Gly, COCH₃, δ-CH_{2a} Pro), 3.56-3.47 (m, 1H, δ-CH_{2b} Pro), 3.46-2.95 (m, 20H, 6x CH₂-O PEG, 2x CH₂-N PEG, S-CH₂ Far, β-CH₂ Cys), 2.86-2.75 (m, 7H, N-C(CH₃)₃, β-CH_{2a} Cys), 2.69 (dd, *J* = 13.60, 7.92 Hz, 1H, β-CH_{2b} Cys), 2.48-2.42 (m, 2H, γ-CH₂ Met), 2.41-2.29 (m, 4H, CONH-CH₂-CH₂-CONH), 2.10-1.79 (m, 17H, 2x CH₂-CH₂ Far, 2x CH₂ Pro, CH₃ Met, β-CH₂ Met), 1.67-1.47 (m, 17H, 4x CH₃ Far, 2x CH₂ PEG, γ-CH Leu), 1.48-1.39 (m, 2H β-CH₂ Leu), 1.28 (s, 9H S-C(CH₃)₃), 0.93-0.82 (m, 6H, 2x CH₃ Leu).

LC-MS: 10.77 min (C4); 1521.29 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 1521.72979 berechnet [C₇₂H₁₁₇O₁₅N₁₀S₅], gefunden: 1521.73008 [M+H]⁺

[α]_D²⁰ = -55.9° (MeOH, c = 0.52)

Dansyl-(S-farnesyl)-L-cystein-methylester 35

[Dansyl-Cys(Far)OMe]

Eine Lösung von 100 mg Cys(Far)-OMe **2** (0.29 mmol) in 10 ml trockenem DCM wurde in einem Eisbad auf 0 °C temperiert und danach 85.2 mg Dansylchlorid (0.31 mmol, 1.1 Äq.) und 80.4 µl Triethylamin (0.58 mmol, 2.0 Äq.) in die Lösung gegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Rühren über Nacht auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurde das Reaktionsgemisch dreimal mit 1 M Essigsäure und dreimal mit 1 M NaOH-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das orange gelbliche Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: PE/EE 9:1 → PE/EE 4:1). Die Ausbeute betrug 134.4 mg (0.23 mmol, 81%) eines gelb-grünlichen Schaums.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8.78 (d, *J* = 8.83 Hz, 1H, NH), 8.51 (d, *J* = 8.48 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.32 (d, *J* = 8.63 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.15 (dd, *J* = 7.25, 0.85 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.61 (dd, *J* = 16.08, 8.45 Hz, 2H, 2x CH arom. Dansyl), 7.34 (d, *J* = 7.38 Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 5.10-4.99 (m, 2H, 2x CH=C Far), 4.94 (t, *J* = 7.42 Hz, 1H, CH=C Far), 3.81 (dd, *J* = 16.16, 7.52 Hz, 1H, α-CH), 3.17 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.92 (dd, *J* = 7.99, 3.04 Hz, 2H, S-CH₂ Far), 2.88 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.66-2.61, 2.55-2.52 (m, 2H, β-CH₂), 2.05-1.85 (m, 8H, 2x CH₂-CH₂ Far), 1.65-1.61 (m, 3H, CH₃ Far), 1.57-1.52 (m, 6H, 2x CH₃ Far), 1.46 (s, 3H, CH₃ Far).

¹³C-NMR (100.5 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 170.2 (CO₂CH₃), 150.1 (C_q arom. Dansyl), 138.5 (HC=C, Far), 135.7 (C_q arom. Dansyl), 134.4 (HC=C, Far), 130.5 (HC=C, Far), 129.3 (CH arom. Dansyl), 128.9 (C_q arom. Dansyl), 128.6 (CH arom. Dansyl), 128.5 (C_q arom. Dansyl), 127.6 (CH arom. Dansyl), 124.0 (CH=C Far), 123.6 (HC=C, Far), 123.5 (CH arom. Dansyl, CH=C Far), 119.9 (CH arom. Dansyl), 119.6 (CH=C Far), 115.4 (CH arom. Dansyl), 55.5 (α-CH), 51.4 (CO₂CH₃), 45.1 (N(CH₃)₂), 39.1, 38.8 (2x CH₂-CH₂ Far), 31.9 (β-CH₂), 28.3 (S-CH₂ Far), 26.0, 25.6 (2x CH₂-CH₂ Far), 25.4, 17.4, 15.6, 15.4 (4x CH₃ Far).

R_F-Wert: 0.30 (PE/EE 4:1)

LC-MS: 11.03 min (C4) ; 573.05 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 573.28152 berechnet [$C_{31}H_{44}N_2O_4S_2$], gefunden: 573.28115 $[M+H]^+$
 $[\alpha]^{20} = 10.6^\circ$ (DCM, $c = 1.28$)

Synthese von all-trans-Geranylgeranylchlorid **36** [GerGerCl]

Eine Lösung von 239 mg *N*-Chlorsuccinimid (1.79 mmol, 1.5 eq) in 10 ml trockenem DCM wurde unter Schutzgasatmosphäre auf -40°C abgekühlt und 131 μl trockenes Dimethylsulfid (1.79 mmol, 1.5 eq) langsam zugetropft. Es wurde weitere 5 min bei -40°C gerührt, dann auf 0°C erwärmt und 5 min gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf -40°C wurden 347 mg all-trans-Geranylgeraniol (1.20 mmol) in 8 ml trockenem DCM langsam zugetropft. Anschließend wurden für je 30 min bei -40°C bzw. 0°C und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt.

Der Reaktionsansatz wurde auf 20 ml kalte, gesättigte Natriumchloridlösung gegossen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit DCM extrahiert. Zu den vereinigten organischen Phasen wurden zusätzliche 15 ml DCM gegeben und es wurde zweimal mit jeweils 20 ml kalter, gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt für 16 h im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Produkt konnte ohne weitere Reinigungsschritte verwendet werden. Die Ausbeute betrug 365 mg (1.2 mmol, 99%) eines gelbstichigen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 5.48-5.42 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 5.15-5.07 (m, 3H, 3x $\text{CH}=\text{C}$), 4.10 (d, $J = 7.97$ Hz, 2H, S- CH_2), 2.17-1.93 (m, 12H, 3x CH_2-CH_2), 1.74-1.66 (m, 6H, 2x CH_3), 1.62-1.58 (m, 9H, 3x CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 142.7, 135.6, 134.9, 131.2 (4x $\text{CH}=\text{C}$), 124.3, 124.1, 123.4, 120.2 (4x $\text{CH}=\text{C}$), 41.1 (S- CH_2), 39.7, 39.6, 39.4 (3x CH_2-CH_2), 26.7, 26.5, 26.1 (3x CH_2-CH_2), 25.6, 17.6, 16.0, 16.0, 15.9 (5x CH_3).

Synthese von S-all-trans-Geranylgeranyl-L-cystein-methylester **37** [Cys(GerGer)OMe]

Eine Lösung von 196 mg L-Cysteinmethylester Hydrochlorid (1.1 mmol) in 7 ml 4 N Ammoniak/MeOH Lösung wurde unter Schutzgas auf 0°C abgekühlt. Es wurden 352 mg Geranylgeranylchlorid **36** (1.1 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Das Lösungsgemisch wurde anschließend 3 h bei 0°C sowie 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels

Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel: DCM → DCM/MeOH 9:1). Die Ausbeute betrug 280 mg (0.69 mmol, 63%) eines gelbstichigen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 5.26-5.19 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 5.13-5.06 (m, 3H, 3x $\text{CH}=\text{C}$), 3.74 (s, 3H, COCH_3), 3.63 (dd, $J = 7.71, 4.64$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 3.23-3.11 (m, 2H, S-CH_2), 2.77 (ddd, $J = 21.26, 13.55, 6.17$ Hz, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 2.16-1.93 (m, 12H, 3x $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.77 (bs, 2H, NH_2), 1.68-1.65 (m, 6H, 2x CH_3), 1.61-1.58 (m, 9H, 3x CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 174.5 (COCH_3), 139.5, 135.3, 134.9, 131.2 (4x $\text{CH}=\text{C}$), 124.3, 124.1, 123.7, 119.9 (4x $\text{CH}=\text{C}$), 54.2 ($\alpha\text{-CH}$), 52.1 (COCH_3), 39.7, 39.6, 39.6 (3x $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 36.4 ($\beta\text{-CH}_2$), 29.8 (S-CH_2), 26.7, 26.6, 26.4 (3x $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 25.6, 17.6, 16.1, 16.0, 15.9 (5x CH_3).

R_f -Wert: 0.30 (DCM/MeOH 95:5)

LC-MS: 9.57 min (C4) ; 408.02 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$[\alpha]^{20} = 5.2^\circ$ (DCM, $c = 2.93$)

Synthese von Dansyl-(S-all-trans-Geranylgeranyl)-L-cystein-methylester **38**

[Dansyl-Cys(GerGer)OMe

Eine Lösung von 65.0 mg Cys(GerGer)OMe **37** (0.16 mmol) in 5 ml trockenem DCM wurde in einem Eisbad auf 0 °C temperiert. Danach wurden 47.3 mg Dansylchlorid (0.18 mmol, 1.1 Äq.) und 44 μl Triethylamin (0.32 mmol, 2.0 Äq.) in die Lösung gegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Rühren über Nacht auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurde das Reaktionsgemisch dreimal mit 1 M Essigsäure und dreimal mit 1 M NaOH-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das orange gelbliche Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: PE/EE 9:1 → PE/EE 4:1). Die Ausbeute betrug 73.0 mg (0.11 mmol, 71%) eines gelb-grünlichen Schaums.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 8.54 (d, $J = 8.44$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.30 (d, $J = 8.64$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 8.24 (dd, $J = 7.28, 0.99$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.59 (dd, $J = 8.41, 7.89$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.50 (dd, $J = 8.41, 7.43$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 7.19 (d, $J = 7.38$ Hz, 1H, CH arom. Dansyl), 5.62 (d, $J = 8.09$ Hz, 1H, NH), 5.15-5.02 (m, 4H, 4x $\text{CH}=\text{C}$), 4.12 (dd, $J = 14.30, 7.18$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 3.35 (s, 3H, COCH_3), 2.96 (d, $J = 7.67$ Hz, 2H, S-CH_2), 2.87 (s, 6H, $\text{NC}(\text{CH}_3)_3$),

2.80-2.68 (m, 2H, β -CH₂), 2.11-1.93 (m, 12H, 3x CH₂-CH₂), 1.68 (s, 3H, CH₃), 1.61-1.54 (m, 12H, 3x CH₃).

¹³C-NMR (100.5 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 170.3 (COCH₃), 140.1, 135.3, 134.9, 134.5, 131.2, 130.7, 129.6, 128.4, 124.3, 124.1, 123.7, 123.1, 119.3 (4x CH=C, 4x CH=C, 4x C_q arom. Dansyl, 5x CH arom. Dansyl), 115.3 (CH arom. Dansyl), 55.6 (α -CH), 52.3 (CO₂CH₃), 45.4 (N(CH₃)₂), 39.7, 39.6, 34.0 (3x CH₂-CH₂ GerGer), 29.8 (β -CH₂), 26.7, 26.6, 26.4 (3x CH₂-CH₂ GerGer, S-CH₂ GerGer), 25.6, 17.6, 16.0, 16.0, 16.0 (5x CH₃ GerGer).

R_F-Wert: 0.23 (EE/cHex 4:1)

LC-MS: 11.31 min (C4) ; 641.25 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 641.34413 berechnet [C₃₅H₅₃N₂O₄S₂], gefunden: 641.34377 [M+H]⁺

$[\alpha]^{20} = 15.3^\circ$ (DCM, c = 1.57)

Fluoreszenzpolarisationsmessungen

Fluoreszenzpolarisationsmessungen wurden an einem *FluoroMax II* Fluoreszenzspektrometer (*Spex Instruments*, Grasbrunn) in 0.5x1 cm Quarzglas-Küvetten (*Hellma*, Müllheim, Baden) durchgeführt. Die Messungen wurden mit 1 mm Spaltbreiten für die Anregung und 2 mm Spaltbreiten für die Emissionen aufgenommen. Für Messungen mit dansylmodifizierten Peptiden wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 540 nm beobachtet. Für GppNHp beladenes K-Ras4B **15** wurde bei 366 nm angeregt und die Emission bei 450 nm beobachtet. Die Messungen erfolgten in einer temperierten Küvette bei 20 °C.

Für die Fluoreszenzpolarisationsmessungen wurden 450 μ l einer 1 μ M Lösung (30 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 3 mM DTE) bezogen auf den Fluorophor des entsprechenden fluoreszenten Peptids/Proteins vorgelegt und mit PDE δ -GST titriert.

Für jede PDE δ -GST Konzentration wurden mindestens 20 Polarisationsmesspunkte aufgenommen, gemittelt und gegen die entsprechende PDE δ -GST Konzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte über nichtlineare Regression über folgendes Bindungsmodell:

$$\text{Bindung} = \frac{[\text{Ligand}] \cdot B_{\text{max}}}{[\text{Ligand}] + K_D} + C$$

6.8 Versuche zu Kapitel 4.4

Herstellung der Lipidvesikel

Die beiden Lipide POPC und POPS wurden in entsprechender Konzentration in Chloroform gelöst und in den notwendigen Verhältnissen von POPC, POPC mit 20% und 40% POPS gemischt. Das Chloroform wurde im Stickstoffgegenstrom größtenteils entfernt und das restliche Chloroform über Nacht im Hochvakuum evaporiert. In diesem Zustand können die Lipidfilme bei -20°C gelagert werden.

Die Lipidfilme werden mit 1 ml HEPES Puffer (10 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, pH 7.4) resuspendiert, intensiv geschüttelt und auf eine Konzentration von 3 mM eingestellt. Danach wurde die Lipidlösung für 15 min in einem auf 40°C temperierten Ultraschallbad inkubiert gefolgt von 5 Frier-Tau-Zyklen und kurzen Inkubationszeiten im Ultraschallbad. Große Unilamellare Vesikel (LUV) wurden durch die Filtration der Lösung durch einen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 100 nm hergestellt. Die extrudierte Lösung wurde dann auf eine Konzentration von 0.5 mM verdünnt.

Oberflächenplasmonenresonanz Experimente

Die Versuche wurden mit einem Biacore 3000 System bei 25°C (Biacore, Uppsala, Sweden) durchgeführt und alle Proben im Autosampler bei 13°C gelagert.

Der L1-Chip wurde viermal mit Laufpuffer (10 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, pH 7.4) initialisiert und danach mit Reinigungsprogramm mit 30 µl (2-propanol/50 mM NaOH (2:3)), 10 µl (40 mM Octyl β-D-glucopyranoside) und 30 µl (20 mM Chaps, 100 mM NaCl, 20 mM CaCl₂) bei einer Flussrate von 5 µL/min gewaschen.

Danach wird die Chipoberfläche zweimal mit je 15 µl der Lipidvesikellösung bei einer Flussrate von 2 µl/min gespült. Die auf dem L1-Chip adsorbierte Membran wurde durch Spülen mit 50 µL Laufpuffer bei einer Flussrate von 100 µl/min und durch drei Injektionen von jeweils 10 µL 25 mM NaOH bei einer Flussrate von 5 µL/min stabilisiert. Zur Vorbereitung der Injektion von Proteinlösung wurden 40 µl Laufpuffer bei einer Flussrate von 20 µl/min injiziert. Für jedes Lipidsystem wurde eine separate Flusszelle verwendet. Nachdem sich das Ausgangssignal stabilisiert hatte, wurden nacheinander 40 µl von unterschiedlichen 2µM K-Ras4B Analoga Lösungen in Laufpuffer bei einer Flussrate von 20 µl/min injiziert. Die hohe Flussrate wurde

gewählt um den Effekt des Massentransfers und das Rückbinden von schon dissoziierten Proteinen zu verhindern. Die Dissoziation wurde 30 min lang beobachtet, danach wurde der Chip mit dem schon erwähnten Waschprogramm gereinigt und stand für weitere Messungen zu Verfügung. Alle Lösungen wurden bevor sie für die Messungen benutzt wurden filtriert (0.2 µM Filter) und entgast. Alle Sensogramme wurden bei einer Frequenz von 10 Hz aufgenommen. Die Beeinflussung des Messsignals durch den Puffer in dem die Proteine verdünnt wurden, wurde von den erhaltenen Sensogrammen subtrahiert. Der Lipidbelegungsgrad des L1-Chips wurde vor jeder Messung durch die Injektion einer 0.5 µM Lösung von BSA bestimmt und lag bei allen Messungen mindestens bei 80%.

Für die Datenauswertung wurde das Messsignal vor der Injektion auf 0 gesetzt. Die Anfangssteigung der Sensogramme wurde mit der BIAevaluation Software 4.1 ausgewertet. Die ersten 120 Sekunden der Dissoziation wurden durch ein biexponentielles Model mit Hilfe von OriginLab7 angenähert.

Für die Auswertung

$$RU = A_1 \cdot e^{-k_{off1}(t-t_0)} + A_2 \cdot e^{-k_{off2}(t-t_0)} + offset$$

Die beiden Dissoziationskonstanten wurden dann aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit gewichtet nach ihrem Anteil an der Dissoziation zu einer Gesamtdissoziationskonstante zusammengefasst.

$$K_{Gesamt} = k_{off1} \cdot \frac{A_1}{A_1 + A_2} + k_{off2} \cdot \frac{A_2}{A_1 + A_2}$$

Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

6.9 Versuche zu Kapitel 4.5

2-(Tetradecanamido)essigsäure 39 [Myr-Gly]

Eine auf 0 °C temperierten Lösung von 7.50 g Glycin (100 mmol) in 50 ml wässriger 4 N NaOH-Lösung wurde mit 50 ml Et₂O versetzt. Danach wurden 27.1 ml Myristoylchlorid (100 mmol, 1.0 Äq.) unter starkem Rühren innerhalb von 1 h zugetropft. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur gebracht und für eine weitere Stunde gerührt. Die Phasen des Reaktionsgemisches wurden getrennt und

die organische Phase zweimal mit 1 M NaOH-Lösung extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit konzentrierter HCl auf pH 2 eingestellt und das Produkt wurde zweimal mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Ausbeute betrug 17.96 g (63 mmol, 63%) eines weißen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 12.43 (s, 1H, COOH), 8.08 (t, *J* = 5.82 Hz, 1H, NH), 3.71 (d, *J* = 5.91 Hz, 2H, α-CH₂ Gly), 2.10 (t, *J* = 7.44 Hz, 2H, NHCOCH₂-), 1.47 (m, 2H, NHCOCH₂-CH₂), 1.30-1.20 (m, 20H, 10x CH₂ Myr), 0.85 (t, *J* = 6.84 Hz, 3H, CH₃ Myr).

¹³C-NMR (100.5 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 173.1 (COOH), 172.0 (CONH), 41.1 (α-CH₂ Gly), 35.7 (NHCOCH₂-), 31.9 (-CH₂-CH₂-CH₃), 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3 (7x CH₂ Myr), 25.8 (NHCOCH₂-CH₂), 22.7 (-CH₂-CH₃), 14.5 (CH₃ Myr).

R_F-Wert: 0.11 (EE/(AcOH/EE/H₂O/MeOH 3:3:2:3) 95:5)

LC-MS: 9.33 min (C4)

ESI-MS (negativ-Modus): 284.13 [M-H]⁻

HRMS (ESI): 286.23767 berechnet [C₁₆H₃₂O₃N+H]⁺, gefunden: 286.23780.

Tetradecanamido-glycyl-(*S*-*tert*-butylthio)-L-cysteyl-L-threonyl-L-leucyl-L-seryl-L-alanyl-(6-maleimidocarpronsäureamid)- L-lysyl-allyl-ester 40

[Myr-Gly-Cys(StBu)-Thr-Leu-Ser-Ala-Lys(MIC)OAll]

An 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotryl Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) wurde die entsprechenden Peptidsequenz durch repetitive Anwendung der AAV 8 mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Ala, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Cys(StBu), FmocLeu, Fmoc-Thr(tBu) und Myr-Gly 39 verwendet. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF und DCM und Trocknen über Nacht im Hochvakuum wurde das geschützte Peptid quantitativ vom polymeren Träger mit DCM/TFA/TES 97:1:2 abgespalten. Nach wiederum mehrmaligem Waschen des Harzes mit DCM, MeOH und DCM/MeOH wurden die vereinigten organischen Phasen mit Toluol unter vermindertem Druck coevaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels LC-MS untersucht:

LC-MS: Myr-Gly-Cys(StBu)-Thr(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Ala-LysOAll:

R_F: 7.54 min (C4*) ; 1129.91 [M+H]⁺

Das Rohprodukt wurde in DMF gelöst und mit 31.7 mg Maleinimidocaprinsäure (0.15 mmol, 1.5 Äq.), 95.1 mg HATU (0.25 mmol, 2.5 Äq.) und 41.6 μ L Triethylamin (0.3 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Fortschreiten der Reaktion mittels LC-MS überprüft. Dafür wurde eine analytische Menge der Reaktionslösung für 2 h bei Raumtemperatur mit DCM/TFA 1:1 gerührt und dann mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und mittels analytischer LC-MS überprüft:

LC-MS: Myr-Gly-Cys(StBu)-Thr-Leu-Ser-Ala-Lys(MIC)OAll:

R_f: 8.64 min (C4*) ; 1210.44 [M+H]⁺

Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt in DCM/TFA 1:1 für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach der Lyophilisation wurden 8.4 mg (7 μ mol, 7%) eines weißen Pulvers erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 8.22 (d, *J* = 8.03 Hz, 1H, NH Cys), 8.17 (d, *J* = 7.17 Hz, 1H, Lys NH), 8.11 (t, *J* = 5.67, 5.67 Hz, 1H, Gly NH), 7.97-7.87 (m, 3H, NH Ala, NH Thr; NH Ser), 7.84 (d, *J* = 7.97 Hz, 1H, NH Leu), 7.74 (t, *J* = 5.48 Hz, 1H, ϵ -CH₂-NH Lys), 7.00 (s, 2H, CH=CH MIC), 5.88 (tdd, *J* = 17.32, 10.58, 5.31 Hz, 1H, CH=CH₂ OAll), 5.30 (dd, *J* = 17.25, 1.57 Hz, 1H, CH=CH₂ OAll), 5.20 (dd, *J* = 10.53, 1.33 Hz, 1H, CH=CH₂ OAll), 4.65-4.57 (m, 1H, α -CH Cys), 4.57-4.53 (m, 2H, CH₂ OAll), 4.36-4.22 (m, 3H, α -CH Leu, α -CH Ala, α -CH Ser), 4.22-4.14 (m, 2H, α -CH Thr, α -CH Lys), 4.01-3.94 (m, 1H, β -CH Thr), 3.74-3.68 (m, 2H, CH₂, Gly), 3.61-3.48 (m, 2H, β -CH₂ Ser), 3.37 (t, *J* = 7.05 Hz, 2H, CH₂-N MIC), 3.16-3.05 (m, 1H, β -CH₂ Cys), 3.02-2.91 (m, 3H, β -CH₂ Cys, ϵ -CH₂ Lys), 2.11 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H, CH₂-CONH Myr), 2.01 (t, *J* = 7.39 Hz, 2H, CH₂-CONH MIC), 1.74-1.56 (m, 3H, β -CH₂ Lys, γ -CH Leu), 1.54-1.41 (m, 8H, 2x CH₂ MIC, β -CH₂ Leu, CH₂-CH₂-CONH Myr), 1.39-1.32 (m, 2H, δ -CH₂ Lys), 1.31-1.20 (m, 36H, CH₃ Ala, 10x CH₂ Myr, CH₂ MIC, S-C(CH₃)₃, γ -CH₂ Lys), 1.02 (d, *J* = 6.33 Hz, 3H, CH₃ Thr), 0.89-0.80 (m, 9H, 2x CH₃ Leu, CH₃ Myr).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 172.7, 172.1, 171.8, 171.6, 171.3, 170.9, 169.6, 169.4, 169.3, 169.1 (CONH Myr, CONH Gly, CONH Ala, CONH Leu, CONH Ser, CONH Thr, CONH Cys, CONH MIC, CONCO MIC, COOAll), 134.3 (CH=CH MIC), 132.2 (CH=CH₂ OAll), 117.5 (CH=CH₂ OAll), 66.3 (β -CH Thr), 64.6 (CH₂ OAll), 61.4 (β -CH₂ Ser), 58.2 (α -CH Thr), 54.8 (α -CH Ser), 52.2 (α -CH Lys), 51.9 (α -CH Leu), 51.0 (α -CH Cys), 47.7 (α -CH Ala), 45.4 (S-C(CH₃)₃), 42.4 (β -CH₂ Cys), 41.9 (α -CH₂ Gly), 40.4 (β -CH₂ Leu), 37.9 (ϵ -CH₂ Lys), 36.8 (CH₂-N MIC), 35.0, 35.0 (CH₂-

CONH Myr, CH₂-CONH MIC), 31.1 (CH₂-CH₂-CH₃ Myr), 30.2 (β-CH₂ Lys), 29.4 (S-C(CH₃)₃), 28.9, 28.9, 28.9, 28.9, 28.8, 28.7, 28.5, 28.5, 27.6 (δ-CH₂ Lys, 7x CH₂ Myr, CH₂ MIC), 25.7, 25.0, 24.6 (2x CH₂ MIC, CH₂ Myr), 23.9 (γ-CH Leu), 23.0 (CH₃ Leu), 22.6, 21.9 (γ-CH₂ Lys, CH₂ Myr) 21.3 (CH₃ Leu), 19.4 (CH₃ Thr), 17.9 (CH₃ Ala), 13.8 (CH₃ Myr).

LC-MS: 8.30 min (C4*); 1210.43 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 1210.68257 berechnet [C₅₈H₉₉O₁₄N₉S₂+H]⁺, gefunden: 1210.68257

[α]_D²⁰ = -23.6° (DMSO, c = 1.0)

Tetradecanamido-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-leucyl-L-seryl-L-alanyl-(6-maleimidocarbonsäureamid)-L-lysyl-allyl-ester 41

[Myr-Gly-Ser-Thr-Leu-Ser-Ala-Lys(MIC)OAll]

An 250 mg eines nach AAV 2 mit Fmoc-Lys-OAll beladenen 2-Chlorotriptyl Harzes (Beladungsbestimmung nach AAV 4: 0.40 mmol/g) wurde die entsprechenden Peptidsequenz durch repetitive Anwendung der AAV 8 mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Ala, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Leu, Fmoc-Thr(tBu) und Myr-Gly 39 verwendet. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF und DCM und Trocknen über Nacht im Hochvakuum wurde das geschützte Peptid quantitativ vom polymeren Träger mit DCM/TFA/TES 97:1:2 abgespalten. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) des Harzes mit DCM, MeOH und DCM/MeOH wurden die vereinigten organischen Phasen mit Toluol unter vermindertem Druck coevaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels LC-MS untersucht:

LC-MS: Myr-Gly-Cys(StBu)-Thr(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Ala-LysOAll:

R_f: 7.84 min (C4*) ; 1081.64 [M+H]⁺

Das Rohprodukt wurde in DMF gelöst und mit 31.7 mg Maleinimidocapronsäure (0.15 mmol, 1.5 Äq.), 95.1 mg HATU (0.25 mmol, 2.5 Äq.) und 41.6 µL Triethylamin (0.30 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Fortschreiten der Reaktion mittels LC-MS überprüft. Dafür wurde eine analytische Menge der Reaktionslösung für 2 h bei Raumtemperatur mit DCM/TFA 1:1 gerührt und dann mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und mittels analytischer LC-MS überprüft:

LC-MS: Myr-Gly-Cys(StBu)-Thr-Leu-Ser-Ala-Lys(MIC)OAll:

R_f: 7.38 min (C4*), 1106.28 [M+H]⁺

Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, dann das Rohprodukt in DCM/TFA 1:1 für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und schließlich mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und mittels präparativer HPLC aufgetrennt. Nach der Lyophilisation wurden 11.6 mg (10 μ mol, 10%) eines weißen Pulvers erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ /ppm: 8.16 (d, $J = 7.25$ Hz, 1H, NH Lys), 8.07 (t, $J = 5.65$ Hz, 1H, NH Gly), 7.97-7.91 (m, 2H, NH Ala, NH Ser), 7.89-7.83 (m, 2H, NH Ser, NH Thr), 7.79 (d, $J = 8.00$ Hz, 1H, NH Leu), 7.74 (t, $J = 5.47, 5.47$ Hz, 1H, $\epsilon\text{-CH}_2\text{-NH Lys}$), 7.00 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH MIC}$), 5.88 (ddd, $J = 22.51, 10.58, 5.31$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2 \text{OAll}$), 5.30 (dd, $J = 17.25, 1.59$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2 \text{OAll}$), 5.20 (dd, $J = 10.54, 1.37$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2 \text{OAll}$), 4.55 (dd, $J = 5.21, 1.17$ Hz, 2H, $\text{CH}_2 \text{OAll}$), 4.45-4.39 (m, 1H, $\alpha\text{-CH Ser}$), 4.35-4.28 (m, 2H, $\alpha\text{-CH Leu}$, $\alpha\text{-CH Ala}$), 4.27-4.22 (m, 1H, $\alpha\text{-CH Ser}$), 4.20-4.14 (m, 2H, $\alpha\text{-CH Lys}$, $\alpha\text{-CH Thr}$), 4.10-4.03 (m, 1H, $\beta\text{-CH Thr}$), 3.75-3.70 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2 \text{Gly}$), 3.66-3.51 (m, 4H, 2x $\beta\text{-CH}_2 \text{Ser}$), 3.37 (t, $J = 7.05$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N MIC}$), 2.99 (dd, $J = 11.77, 6.25$ Hz, 2H, $\epsilon\text{-CH}_2 \text{Lys}$), 2.11 (t, $J = 7.47, 7.47$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CONH Myr}$), 2.01 (t, $J = 7.40, 7.40$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CONH MIC}$), 1.74-1.56 (m, 3H, $\beta\text{-CH}_2 \text{Lys}$, $\gamma\text{-CH Leu}$), 1.52-1.42 (m, 8H, 2x $\text{CH}_2 \text{MIC}$, $\beta\text{-CH}_2 \text{Leu}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH Myr}$), 1.35 (dd, $J = 13.13, 6.46$ Hz, 2H, $\delta\text{-CH}_2 \text{Lys}$), 1.29-1.13 (m, 27H, $\text{CH}_3 \text{Ala}$, 10x $\text{CH}_2 \text{Myr}$, $\text{CH}_2 \text{MIC}$, $\gamma\text{-CH}_2 \text{Lys}$), 1.05 (d, $J = 6.35$ Hz, 3H, $\text{CH}_3 \text{Thr}$), 0.89-0.80 (m, 9H, 2x $\text{CH}_3 \text{Leu}$, $\text{CH}_3 \text{Myr}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ /ppm: 172.6, 172.1, 171.9, 171.6, 171.3, 170.9, 170.3, 169.7, 169.2, 169.0 (CONH Myr, CONH Gly, CONH Ala, CONH Leu, 2x CONH Ser, CONH Thr, CONH MIC, CONCO MIC, COOAll), 134.3 ($\text{CH}=\text{CH MIC}$), 132.2 ($\text{CH}=\text{CH}_2 \text{OAll}$), 117.5 ($\text{CH}=\text{CH}_2 \text{OAll}$), 66.0 ($\beta\text{-CH Thr}$), 64.6 ($\text{CH}_2 \text{OAll}$), 61.5, 61.4 (2x $\beta\text{-CH}_2 \text{Ser}$), 58.4 ($\alpha\text{-CH Thr}$), 54.8, 54.5 (2x $\alpha\text{-CH Ser}$), 51.9 ($\alpha\text{-CH Lys}$), 51.0 ($\alpha\text{-CH Leu}$), 47.7 ($\alpha\text{-CH Ala}$), 41.9 ($\alpha\text{-CH}_2 \text{Gly}$), 40.3 ($\beta\text{-CH}_2 \text{Leu}$), 37.9 ($\epsilon\text{-CH}_2 \text{Lys}$), 36.8 ($\text{CH}_2\text{-N MIC}$), 35.0, 35.0 ($\text{CH}_2\text{-CONH Myr}$, $\text{CH}_2\text{-CONH MIC}$), 31.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3 \text{Myr}$), 30.2 ($\beta\text{-CH}_2 \text{Lys}$), 28.9, 28.9, 28.9, 28.9, 28.8, 28.7, 28.5, 28.5, 27.6 ($\delta\text{-CH}_2 \text{Lys}$, 7x $\text{CH}_2 \text{Myr}$, $\text{CH}_2 \text{MIC}$), 25.7, 25.0, 24.6, (2x $\text{CH}_2 \text{MIC}$, $\text{CH}_2 \text{Myr}$) 23.9 ($\gamma\text{-CH Leu}$), 22.9 ($\text{CH}_3 \text{Leu}$), 22.6, 21.9 ($\gamma\text{-CH}_2 \text{Lys}$, $\text{CH}_2 \text{Myr}$), 21.3 ($\text{CH}_3 \text{Leu}$), 19.7 ($\text{CH}_3 \text{Thr}$), 17.9 ($\text{CH}_3 \text{Ala}$), 13.8 ($\text{CH}_3 \text{Myr}$).

LC-MS: 7.35 min (C4*); 1106.19 $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ESI):

$[\alpha]^{20} = -7.3^\circ$ (DCM, $c = 0.52$)

136

Tetradecanamido-glycyl-(S-tert-butylthio)-L-cysteyl-L-valyl-L-glutamyl-(S-tert-butylthio)-L-cysteyl-L-lysyl-(6-maleimidocarbonsäureamid)-L-lysyl-carbonsäureamid 44

[Myr-Gly-Cys(StBu)-Val-Gln-Cys(StBu)-Lys-Lys(MIC)NH₂]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 138 mg eines Fmoc geschützten Rink Amid Harzes (Beladung 0.72 mmol/g) nach AAV **3** mit 256.3 mg FmocLys(Mmt) beladen. Die entsprechende Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV **8** am polymeren Träger mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Cys(StBu), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Val und Myr-Gly **39** verwendet. Die Synthese des Peptides wurde durch Abspaltung und Aufarbeitung im analytischen Maßstab nach AAV **12** überwacht.

LC-MS: Myr-Gly-Cys(StBu)-Val-Gln-Cys(StBu)-Lys-Lys-NH₂:

R_f: 7.78 min (C4), 1150.42 [M+H]⁺

Die Mmt-Schutzgruppe wurde nach AAV **10** abgespalten. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF wurde das freigesetzte Amin direkt mit 84.4 mg MIC (0.40 mmol, 4.0 Äq.), 165.5 mg HCTU (0.40 mmol, 4.0 Äq.) und 136 µL DIPEA (0.80 mmol, 8.0 Äq.) bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde mittels analytischer Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV **12** überprüft und war nach 16 h beendet.

LC-MS: Myr-Gly-Cys(StBu)-Val-Gln-Cys(StBu)-Lys-Lys(MIC)-NH₂:

R_f: 8.84 min (C4), 1343.50 [M+H]⁺

Danach wurde sowohl dreimal mit DMF als auch DCM gewaschen und das Harz über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Die quantitative Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger erfolgte nach AAV **14**. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach der Lyophilisation wurden 14.7 mg (11 µmol, 11%) eines weißen Pulvers erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.23-7.95 (m, 5H, 2x NH Cys, NH Gln, NH Gly, NH Lys), 7.90-7.79 (m, 1H, -NH- Val), 7.79-7.57 (m, 4H, NH Lys, ε-CH₂-NH Lys, NH₂ Lys), 7.35-7.20 (m, 2H, CONH₂), 7.03-6.94 (m, 2H, MIC), 6.81-6.73 (m, 2H, CONH₂), 4.69-4.41 (m, 2H, 2x α-Cys), 4.30-4.06 (m, 4H, α-CH Gln, α-CH Val, 2x α-CH Lys), 3.77-3.66 (m, 2H, α-CH₂ Gly), 3.46-3.28 (m, 2H, CH₂-N MIC), 3.18-3.03 (m, 2H, β-CH₂ Cys), 3.02-2.87 (m, 4H, β-CH₂ Cys, ε-CH₂-NH Lys), 2.82-2.68 (m, 2H, ε-CH₂-NH₂ Lys), 2.19-1.94 (m, 7H, γ-CH₂ Gln, β-CH Val, CH₂-CONH Myr, CH₂-CONH MIC), 1.92-

1.80 (m, 1H, β -CH₂ Gln), 1.79-1.41 (m, 15H, β -CH₂ Gln, 2x β -CH₂ Lys, 2x δ -CH₂ Lys, CH₂-CH₂-CONH Myr, 2x CH₂ MIC), 1.40-1.11 (m, 44H, 2x S-C(CH₃)₃, 10x CH₂ Myr, 2x γ -CH₂ Lys, CH₂ MIC), 0.90-0.75 (m, 9H, 2x CH₃ Val, CH₃ Myr).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 173.7, 173.3 (CONH₂ Glu, CONH₂ Lys), 172.6, 171.5, 171.2, 170.9, 170.7, 170.5, 169.6, 169.4, 169.3 (CONH Gly, 2x CONH Cys, CONH Val, CONH Gln, CONH Lys, CONH MIC, CONCO MIC, CONH Myr), 134.3 (CH=CH MIC), 57.8 (α -CH Val), 52.2 (α -CH Glu, 2x α -CH Cys, α -CH Lys, α -CHCONH₂ Lys), 47.5, 47.5 (S-C(CH₃)₃), 42.4 (2x β -CH₂ Cys), 42.0 (α -CH₂ Gly), 38.6 (ϵ -CH₂-NH₂ Lys), 38.2 (ϵ -CH₂-NH Lys), 36.8 (CH₂-N MIC), 35.0, 35.0 (CH₂-CONH Myr, CH₂-CONH MIC), 31.6-31.1 (γ -CH₂ Gln, 2x β -CH₂ Lys, 2x δ -CH₂ Lys, CH₂-CH₂-CH₃ Myr), 30.3 (β -CH Val), 29.4, 29.4 (2x S-C(CH₃)₃), 28.9, 28.8, 28.8, 28.7, 28.5, 27.6, 26.4, 25.7, 25.0, 24.6, 22.6 (9x CH₂ Myr, 3x CH₂ MIC, β -CH₂ Gln, CH₂-CH₃ Myr), 21.9 (2x γ -CH₂ Lys), 19.0, 18.0 (2x CH₃ Val), 13.8 (CH₃ Myr).

LC-MS: 8.84 min (C4); 1343.55 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 1343.7321 berechnet [C₆₂H₁₁₀O₁₂N₁₂S₄]⁺, gefunden: 1343.7321 [M+H]⁺

[α]_D²⁰ = -23.3° (DMSO, c = 0.61)

Tetradecanamido-glycyl-L-seryl-L-valyl-L-glutaminyll-L-seryl-L-lysyl-(6-maleimidocarbonsäureamid)-L-lysyl-carbonsäureamid 45

[Myr-Gly-Ser-Val-Gln-Ser-Lys-Lys(MIC)NH₂]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 138 mg eines Fmoc geschützten Rink Amid Harzes (Beladung 0.72 mmol/g) nach AAV **3** mit 256.3 mg FmocLys(Mmt) beladen. Die entsprechende Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV **8** am polymeren Träger mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Val und Myr-Gly **39** verwendet. Die Synthese des Peptides wurde durch Abspaltung und Aufarbeitung im analytischen Maßstab nach AAV **12** überwacht.

LC-MS: Myr-Gly-Ser(tBu)-Val-Gln-Ser(tBu)-Lys-Lys-NH₂:

R_f: 6.88 min (C4), 942.45 [M+H]⁺

Die Mmt-Schutzgruppe wurde nach AAV **10** abgespalten und nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF das freigesetzte Amin direkt mit 84.4 mg MIC (0.40 mmol, 4.0 Äq.), 165.5 mg HCTU (0.40 mmol, 4.0 Äq.) und 136 μ L DIPEA (0.80 mmol, 8.0 Äq.) bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde

mittels analytischer Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV **12** überprüft und war nach 16 h beendet.

LC-MS: Myr-Gly- Ser(tBu)-Val-Gln- Ser(tBu)-Lys-Lys(MIC)-NH₂:
 R_f: 7.67 min (C4), 1135.60 [M+H]⁺

Danach wurde sowohl dreimal mit DMF als auch DCM gewaschen und das Harz über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Die quantitative Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger erfolgt nach AAV **14**. Das Rohprodukt wird in MeOH gelöst und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach der Lyophilisation wurden 11.4 mg (10 µmol, 10%) eines weißen Pulvers erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.15-7.96 (m, 3H, NH Gln, NH Gly, NH Lys), 7.94-7.76 (m, 3H, 2x NH Ser, NH Val), 7.76-7.61 (m, 4H, NH Lys, ε-CH₂-NH Lys, NH₂ Lys), 7.32-7.10 (m, 2H, CONH₂), 7.07-6.95 (m, 2H, CH=CH MIC), 6.82-6.71 (m, 2H, CONH₂), 5.25-4.94 (m, 2H, 2x OH), 4.44-4.03 (m, 6H, 2x α-CH Ser, 2x α-CH Lys, α-CH Gln, α-CH Val), 3.81-3.67 (m, 2H, α-CH₂ Gly), 3.66-3.47 (m, 4H, 2x β-CH₂ Ser), 3.43-3.34 (m, 2H, CH₂-N MIC), 3.02-2.92 (m, 2H, ε-CH₂-NH Lys), 2.80-2.70 (m, 2H, ε-CH₂-NH₂ Lys), 2.18-1.96 (m, 7H, γ-CH₂ Gln, β-CH Val, CH₂-CONH Myr, CH₂-CONH MIC), 1.91-1.83 (m, 1H, β-CH₂ Gln), 1.77-1.41 (m, 15H, β-CH₂ Gln, 2x β-CH₂ Lys, 2x δ-CH₂ Lys, CH₂-CH₂-CONH Myr, 2x CH₂ MIC), 1.37-1.16 (m, 26H, 10x CH₂ Myr, 2x γ-CH₂ Lys, CH₂ MIC), 0.91-0.78 (m, 9H, 2x CH₃ Val, CH₃ Myr).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 173.7, 173.4 (CONH₂ Glu, CONH₂ Lys), 172.5, 171.6, 171.2, 171.0, 170.9, 170.8, 170.2, 170.1, 169.1 (CONH Gly, 2x CONH Cys, CONH Val, CONH Gln, CONH Lys, CONH MIC, CONCO MIC, CONH Myr), 134.3 (CH=CH MIC), 61.5, 61.5 (2x β-CH₂-Ser), 57.8 (α-CH Val), 54.8, 54.6 (2x α-CH Ser), 52.3, 52.3, 52.2 (α-CH Glu, α-CH Lys, α-CHCONH₂ Lys), 42.0 (α-CH₂ Gly), 38.6 (ε-CH₂-NH₂ Lys), 38.2 (ε-CH₂-NH Lys), 36.8 (CH₂-N MIC), 35.0, 35.0 (CH₂-CONH Myr, CH₂-CONH MIC), 31.3, 31.3, 31.1, 30.7, 30.7, 30.6 (γ-CH₂ Gln, 2x β-CH₂ Lys, 2x δ-CH₂ Lys, CH₂-CH₂-CH₃ Myr), 30.0 (β-CH Val) 28.9, 28.8, 28.8, 28.7, 28.5, 27.6, 27.4, 26.4, 25.7, 25.0, 24.6, 22.7 (9x CH₂ Myr, 3x CH₂ MIC, β-CH₂ Gln, CH₂-CH₃ Myr), 22.0, 21.9 (2x γ-CH₂ Lys), 19.1, 17.8 (2x CH₃ Val), 13.8 (CH₃ Myr).

LC-MS: 7.43 min (C4); 1135.56 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 1135.70852 berechnet [C₅₄H₉₅O₁₄N₁₂]⁺, gefunden: 1135.70686 [M+H]⁺

[α]_D²⁰ = -3.4° (DCM, c = 1.0)

Tetradecanamido-glycyl-(S-tert-butylthio)-L-cysteyl-L-isoleucyl-L-lysyl-L-seryl-L-lysyl-(6-maleimidocarbonsäureamid)-L-lysyl-carbonsäureamid 42

[Myr-Gly-Cys(StBu)-Ile-Lys-Ser-Lys-Lys(MIC)NH₂]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 138 mg eines Fmoc geschützten Rink Amid Harzes (Beladung 0.72 mmol/g) nach AAV **3** mit 256.3 mg FmocLys(Mmt) beladen. Die entsprechende Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV **8** am polymeren Träger mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Cys(StBu), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Ile und Myr-Gly **39** verwendet. Die Synthese des Peptides wurde durch Abspaltung und Aufarbeitung im analytischen Maßstab nach AAV **12** überwacht.

LC-MS: Myr-Gly-Cys(StBu)-Ile-Lys-Ser-Lys-Lys-NH₂:

R_f: 6.97 min (C4), 1060.53 [M+H]⁺

Die Mmt-Schutzgruppe wurde nach AAV **10** abgespalten. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF wurde das freigesetzte Amin direkt mit 84.4 mg MIC (0.40 mmol, 4.0 Äq.), 165.5 mg HCTU (0.40 mmol, 4.0 Äq.) und 136 µL DIPEA (0.80 mmol, 8.0 Äq.) bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde mittels analytischer Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV **12** überprüft und endete nach 16 h.

LC-MS: Myr-Gly-Cys(StBu)-Ile-Lys-Ser-Lys-Lys(MIC)-NH₂:

R_f: 7.63 min (C4), 1253.54 [M+H]⁺

Danach wurde sowohl dreimal mit DMF als auch DCM gewaschen und das Harz über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Die quantitative Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger erfolgte nach AAV **14**. Das Rohprodukt wurde in MeOH gelöst und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach der Lyophilisation wurden 13.8 mg (11 µmol, 11%) eines weißen Pulvers erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.18 (d, *J* = 7.85 Hz, 1H, NH Cys), 8.13-8.08 (m, 2H, NH Lys, NH Gly), 7.99 (d, *J* = 7.30 Hz, 1H, NH Lys), 7.90-7.82 (m, 2H, NH Ser, NH Ile), 7.81-7.71 (m, 6H, 2x NH₂ Lys, ε-CH₂-NH Lys, NH Lys), 7.19-7.02 (m, 2H, CONH₂ Lys), 7.00 (s, 2H, CH=CH, MIC), 5.21 (s, 1H, OH), 4.55 (dd, *J* = 13.14, 7.73 Hz, 1H, α-CH Cys), 4.30 (dd, *J* = 12.62, 6.16 Hz, 1H, α-CH Ser), 4.25 (dd, *J* = 13.07, 7.23 Hz, 1H, α-CH Lys), 4.22-4.17 (m, 1H, α-CH Lys), 4.14 (t, *J* = 7.87 Hz, 1H, α-CH Ile), 4.09 (dd, *J* = 13.26, 8.39 Hz, 1H, α-CH-CONH₂ Lys), 3.79-3.68 (m, 2H, α-CH₂ Gly), 3.68-3.60 (m, 1H, β-CH₂ Ser), 3.56-3.48 (m, 1H, β-CH₂ Ser), 3.39-3.36 (m, 2H, CH₂-N MIC), 3.09 (dd, *J* = 12.80, 4.78 Hz, 1H, β-CH₂ Cys), 3.02-2.89 (m, 3H, β-CH₂

Cys, ϵ -CH₂-NH Lys), 2.80-2.70 (m, 4H, ϵ -CH₂-NH₂ Lys), 2.12 (t, J = 7.29 Hz, 2H, CH₂-CONH Myr), 2.01 (t, J = 7.22 Hz, 2H, CH₂-CONH MIC), 1.79-1.57 (m, 5H, 2x β -CH₂ Lys, β -CH Ile), 1.56-1.39 (m, 12H, β -CH₂ Lys, 2x δ -CH₂ Lys, 2x CH₂ MIC, CH₂-CH₂-CONH Myr), 1.38-1.11 (m, 39H, 10x CH₂ Myr, S-C(CH₃)₃, 3x γ -CH₂ Lys, δ -CH₂ Lys, CH₂ MIC), 1.10-1.02 (m, 2H, γ -CH₂ Ile), 0.85 (t, J = 6.56 Hz, 3H, CH₃ Myr), 0.83-0.76 (m, 6H, 2x CH₃ Ile).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 173.5 (CONH₂ Lys), 170.9 (CONCO MIC) 172.6, (CONH Lys), 171.6, 171.3, 171.0, 170.6, 170.2, 169.4, 169.2 (2x CONH Lys, CONH Ser, CONH Ile, CONH Cys, CONH Myr, CONH MIC) 134.3 (CH=CH, MIC), 61.6 (β -CH₂ Ser), 57.0 (α -CH Ile), 54.8 (α -CH Ser), 52.8 (α -CH Lys), 52.4, 52.3, 52.2 (α -CH Cys, α -CH Lys, α -CH-CONH₂ Lys), 47.5 (S-C(CH₃)₃), 42.0, 41.9, (α -CH₂ Gly, β -CH₂ Cys), 38.6, 38.5 (2x ϵ -CH₂-NH₂ Lys), 38.2 (ϵ -CH₂-NH Lys), 36.8 (CH₂-N MIC), 36.3 (β -CH Ile), 35.0, 35.0 (CH₂-CONH Myr, CH₂-CONH MIC), 31.3, 31.3, 31.1, 30.9, 30.7 (3x β -CH₂ Lys, 2x δ -CH₂ Lys, CH₂-CH₂-CH₃ Myr), 29.4 (S-C(CH₃)₃), 28.9, 28.8, 28.8, 28.7, 28.7, 28.6, 28.5, 27.6, 26.4, 25.7, 25.0, 24.6, 24.1, 22.7, 22.0, 21.9 (10x CH₂ Myr, 3x γ -CH₂ Lys, δ -CH₂ Lys, γ -CH₂ Ile, 3x CH₂ MIC), 15.1 (CH₃ Ile), 13.8 (CH₃ Myr), 10.8 CH₃ Ile).

LC-MS: 7.68 min (C4); 1253.57 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 627. 3898 berechnet [C₆₀H₁₁₀O₁₂N₁₂S₂]²⁺, gefunden: 627.3896 [M+2H]²⁺
 $[\alpha]^{20} = -14.9^\circ$ (DMSO, $c = 0.8$)

Tetradecanamido-glycyl-L-seryl-L-isoleucyl-L-lysyl-L-seryl-L-lysyl-(6-maleimidocarbonsäureamid)-L-lysyl-carbonsäureamid 43

[Myr-Gly-Ser-Ile-Lys-Ser-Lys-Lys(MIC)NH₂]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 138 mg eines Fmoc geschützten Rink Amid Harzes (Beladung 0.72 mmol/g) nach AAV **3** mit 256.3 mg FmocLys(Mmt) beladen. Die entsprechende Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV **8** am polymeren Träger mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Ile und Myr-Gly **39** verwendet. Die Synthese des Peptides wurde durch Abspaltung und Aufarbeitung im analytischen Maßstab nach AAV **12** überwacht.

LC-MS: Myr-Gly-CysSer-Ile-Lys-Ser-Lys-Lys-NH₂:
 R_f: 6.55 min (C4), 956.52 [M+H]⁺

Die Mmt-Schutzgruppe wurde nach AAV **10** abgespalten. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF wurde das freigesetzte Amin direkt mit 84.4 mg MIC (0.40 mmol, 4.0 Äq.), 165.5 mg HCTU (0.40 mmol, 4.0 Äq.) und 136 µL DIPEA (0.80 mmol, 8.0 Äq.) bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde mittels analytischer Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV **12** überprüft und war nach 16 h beendet.

LC-MS: Myr-Gly-Ser-Ile-Lys-Ser-Lys-Lys(MIC)-NH₂:
 R_f: 7.07 min (C4), 1149.45 [M+H]⁺

Danach wurde sowohl dreimal mit DMF als auch DCM gewaschen und das Harz über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Die quantitative Abspaltung des Peptides vom polymeren Träger erfolgt nach AAV **14**. Das Rohprodukt wird in MeOH gelöst und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach der Lyophilisation wurden 16.1 mg (14 µmol, 14%) eines weißen Pulvers erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8.13-8.04 (m, 2H, NH Lys, NH Gly), 7.95 (d, *J* = 7.56 Hz, 1H, NH Lys), 7.91 (d, *J* = 7.51 Hz, 1H, NH Ser), 7.85 (d, *J* = 7.86 Hz, 1H, NH Ile), 7.80 (d, *J* = 6.70 Hz, 1H, NH Ser), 7.77-7.70 (m, 6H, ε-CH₂-NH Lys, NH Lys, 2x NH₂ Lys), 7.14-7.03 (m, 2H, CONH₂ Lys), 6.99 (s, 2H, CH=CH), 5.20 (s, 1H OH), 5.07 (s, 1H; OH), 4.37 (dd, *J* = 12.22, 5.59 Hz, 1H, α-CH Ser), 4.29 (d, *J* = 6.27 Hz, 1H, α-CH Ser), 4.23 (dd, *J* = 12.42, 7.98 Hz, 1H, α-CH Lys), 4.20-4.11 (m, 2H, α-CH Lys, α-CH Ile), 4.08 (dd, *J* = 13.18, 8.23 Hz, 1H, α-CH Lys), 3.72 (d, *J* = 4.93 Hz, 2H, α-CH₂ Gly), 3.68-3.59 (m, 2H, β-CH₂ Ser), 3.59-3.50 (m, 2H, β-CH₂ Ser), 3.42-3.37 (m, 2H, CH₂-N MIC), 3.01-2.94 (m, 2H, ε-CH₂-NH Lys), 2.80-2.71 (m, 4H, 2x ε-CH₂-NH₂ Lys), 2.12 (t, *J* = 7.43 Hz, 2H, CH₂-CONH, Myr), 2.01 (t, *J* = 7.07 Hz, 2H, CH₂-CONH MIC), 1.82-1.55 (m, 7H, 3x β-CH₂ Lys, β-CH Ile), 1.55-1.41 (m, 12H, 3x δ-CH₂ Lys, 2x CH₂ MIC, CH₂-CH₂-CONH), 1.38-1.14 (m, 28H, 10x CH₂ Myr, 3x γ-CH₂ Lys, CH₂ MIC), 1.13-1.05 (m, 2H, γ-CH₂ Ile), 0.88-0.78 (m, 9H, 2x CH₃ Ile, CH₃ Myr).

¹³C-NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 173.5 (CONH₂ Lys), 172.7 (CONH Lys), 171.6 171.4, 171.0, 170.9, 170.9, 170.2, 170.2, 169.1 (2x CONH Lys, 2x CONH Cys, CONH Ile, CONH Myr, CONH MIC, CONCO MIC), 134.3 (CH=CH, MIC), 61.5 (2x β-CH₂ Ser), 57.3 (α-CH Ile), 54.7 (2x α-CH Ser), 52.8, 52.3, 52.3 (2x α-CH Lys, α-CH-CONH₂ Lys), 42.0 (α-CH₂ Gly), 38.6, 38.6 (2x ε-CH₂-NH₂ Lys), 38.2 (ε-CH₂-NH Lys), 36.1, 36.1 (β-CH Ile, CH₂-N MIC), 35.1, 35.0 (CH₂-CONH Myr, CH₂-CONH MIC), 31.2, 28.9, 28.8, 28.8, 28.7, 28.7, 28.5, 27.6, 26.4, 26.3, 25.7, 25.0, 24.7, 24.2, 22.7, 22.0, 21.9 (3x β-CH₂ Lys, 3x δ-CH₂ Lys, 3x γ-CH₂ Lys, γ-CH₂ Ile, 11x CH₂ Myr, 3x CH₂ MIC) 15.3 (CH₃ Ile), 13.8 (CH₃ Myr), 11.0 (CH₃ Ile).

LC-MS: 7.14 min (C4); 1149.58 [M+H]⁺

HRMS (ESI): 575.38392 berechnet [C₅₆H₁₀₂O₁₃N₁₂]²⁺, gefunden: 575.38350 [M+2H]²⁺

[α]_D²⁰ = 38.9° (DMSO, c = 0.45)

N-Actyl-L-leucyl-(S-tert-butylthio)-L-cysteyl-(S-tert-butylthio)-L-cysteyl-L-methionyl-L-arginyl-L-arginyl-L-threonyl-L-lysyl-L-glutaminyl-L-valyl-L-glutaminyl-L-lysyl-L-asparaginyll-asparagyl-L-glutamyl-L-asparagyl-L-glutaminyl-L-lysyl-L-isoleucyl-(6-maleimidocarbonsäureamid)-L-lysyl-carbonsäureamid 46

[Ac-Leu-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Met-Arg-Arg-Thr-Lys-Gln-Val-Glu-Lys-Asn-Asp-Glu-Asp-Gln-Lys-Ile-Lys(MIC)NH₂]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 138 mg eines Fmoc geschützten Rink Amid Harzes (Beladung 0.72 mmol/g) nach AAV **3** mit 256.3 mg FmocLys(Mmt) beladen. Die entsprechende Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV **8** am polymeren Träger mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Cys(StBu), Fmoc-Met, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Val, Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Asp(tBu), Fmoc-Ile und Essigsäure verwendet. Die Synthese des Peptides wurde durch Abspaltung und Aufarbeitung im analytischen Maßstab nach AAV **12** überwacht.

LC-MS: Ac-Leu-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Met-Arg-Arg-Thr-Lys-Gln-Val-Glu-Lys-Asn-Asp-Glu-Asp-Gln-Lys-Ile-Lys-NH₂:

R_f: 5.79 min (C18), 895.11 [M+3H]³⁺

Die Mmt-Schutzgruppe wurde nach AAV **10** abgespalten. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF (3x 10 ml) wurde das freigesetzte Amin direkt mit 84.4 mg MIC (0.40 mmol, 4.0 Äq.), 165.5 mg HCTU (0.40 mmol, 4.0 Äq.) und 136 µL DIPEA (0.80 mmol, 8.0 Äq.) bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde mittels analytischer Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV **12** überprüft und war nach 16 h beendet.

LC-MS: Ac-Leu-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Met-Arg-Arg-Thr-Lys-Gln-Val-Glu-Lys-Asn-Asp-Glu-Asp-Gln-Lys-Ile-Lys(MIC)-NH₂:

R_f: 7.59 min (C18), 959.27 [M+3H]³⁺

Danach wurde sowohl dreimal mit DMF als auch DCM gewaschen und das Harz über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Die quantitative Abspaltung und Aufarbeitung des

des Peptides vom polymeren Träger erfolgte nach AAV **14**. Nach präparativer HPLC und Lyophilisation wurden 8.6 mg (3 μ mol, 3%) eines weißen Pulvers erhalten.

LC-MS: 7.43 min (C18); 959.48 [M+3H]³⁺

HRMS (ESI): 959.1421 berechnet [C₁₂₀H₂₁₀O₃₆N₃₅S₅]³⁺, gefunden: 959.1425 [M+3H]³⁺
[α]²⁰ = -48.0° (H₂O, c = 1.0)

N-Actyl-L-leucyl-L-seryl-L-seryl-L-methionyl-L-arginyl-L-arginyl-L-threonyl-L-lysyl-L-glutaminyl-L-valyl-L-glutaminyl-L-lysyl-L-asparaginyll-asparagyl-L-glutamyl-L-asparagyl-L-glutaminyl-L-lysyl-L-iso-leucyl-(6-maleimidocarbonsäureamid)-L-lysyl-carbonsäureamid 47

[Ac-Leu-Ser-Ser-Met-Arg-Arg-Thr-Lys-Gln-Val-Glu-Lys-Asn-Asp-Glu-Asp-Gln-Lys-Ile-Lys(MIC)NH₂]

In einem 0.1 mmolaren Ansatz wurden 138 mg eines Fmoc geschützten Rink Amid Harzes (Beladung 0.72 mmol/g) nach AAV **3** mit 256.3 mg FmocLys(Mmt) beladen. Die entsprechende Peptidsequenz wurde durch repetitive Anwendung der AAV **8** am polymeren Träger mit entsprechenden Doppelkupplungen für alle Aminosäuren aufgebaut. Dafür wurden Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Met, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Val, Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Asp(tBu), Fmoc-Ile und Essigsäure verwendet. Die Synthese des Peptides wurde durch Abspaltung und Aufarbeitung im analytischen Maßstab nach AAV **12** überwacht.

LC-MS: Ac-Leu-Ser-Ser-Met-Arg-Arg-Thr-Lys-Gln-Val-Glu-Lys-Asn-Asp-Glu-Asp-Gln-Lys-Ile-Lys-NH₂:
R_f: 4.76 min (C18), 825.74 [M+3H]³⁺

Die Mmt-Schutzgruppe wurde nach AAV **10** abgespalten. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 ml) mit DMF wurde das freigesetzte Amin direkt mit 84.4 mg MIC (0.40 mmol, 4.0 Äq.), 165.5 mg HCTU (0.40 mmol, 4.0 Äq.) und 136 μ L DIPEA (0.80 mmol, 8.0 Äq.) bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Fortschreiten der Reaktion wurde mittels analytischer Abspaltung und Aufarbeitung nach AAV **12** überprüft und war nach 16 h beendet.

LC-MS: Ac-Leu-Ser-Ser-Met-Arg-Arg-Thr-Lys-Gln-Val-Glu-Lys-Asn-Asp-Glu-Asp-Gln-Lys-Ile-Lys(MIC)-NH₂:
R_f: 6.19 min (C18), 890.21 [M+3H]³⁺

Danach wurde sowohl dreimal mit DMF als auch DCM gewaschen und das Harz über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Die quantitative Abspaltung und Aufarbeitung des

Peptides vom polymeren Träger erfolgte nach AAV **14**. Nach präparativer HPLC und Lyophilisation wurden 26.6 mg (10 µmol, 10%) eines weißen Pulvers erhalten.

LC-MS: 6.15 min (C18); 890.12 [M+3H]³⁺

HRMS (ESI): 667.6025 berechnet [C₁₁₂H₁₉₅O₃₈N₃₅S]⁴⁺, gefunden: 667.6026 [M+4H]⁴⁺
[α]²⁰ = -51.7° (H₂O, c = 0.53)

AAV 17: MIC-Ligation von Cy3-N-Ras/GFP an MIC modifizierte Peptide

Durch Umpuffern über eine HiTrap-Säule (5 ml, *Sephadex G-25 Superfine*) in Bindungspuffer (20 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4) werden 10 mg gereinigtes Cy3-N-Ras Δ 1-181 von überschüssigem Salz und 1,4-Dithioerythrol befreit. In 500 µl MeOH werden 2 Äq. des Peptids (1.0-3.0 mg) gelöst, mit 1 ml einer wässrigen Lösung von 11% Triton X-114 versetzt und mittels Ultraschall homogenisiert. Diese Lösung wird auf 0 °C gekühlt, 1 Äq. des umgepufferten Proteins zugesetzt, mit Argon überschichtet, um eine Oxidation durch Luftsauerstoff zu verhindern und wird für 16 h bei 4 °C unter stetigem Mischen im Drehrad inkubiert. Das Gemisch wird für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert, um eventuell ausgefallenes Protein zu sedimentieren, und anschließend aufgearbeitet.

AAV 18: Aufarbeitung lipidierter myristoylierter Proteine mittels Triton-Extraktion

Das Proteingenmisch wird mit 1 ml Triton (11 % (w/w) *Triton X-114*, 30 mM *Tris*, 100 mM *NaCl*, pH 7.4) versetzt, vermischt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Detergenlösung wird für 5 min auf 37 °C erwärmt und anschließend 5 min bei 4000 rpm bei 30 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen und noch zweimal mit je 1 ml Tritonpuffer extrahiert. Die vereinigten Tritonphasen werden mit 10 ml DEAE-Puffer A (20 mM *Tris*, 5 mM *MgCl*₂, 2 mM *DTE*, pH 7.4) versetzt und reextrahiert.

Das Detergens wird entfernt, indem das Protein reversibel an einen DEAE-Anionenaustauscher gebunden wird. Die gewaschenen Tritonphasen werden mit 9 Volumen Puffer A versetzt. Die DEAE-Säule (30 ml, *GE Healthcare*) wird mit 5 Säulenvolumen Puffer A equilibriert, mit der detergens-haltigen Proteinlösung beladen und mit 10 Säulenvolumen Puffer A gespült. Das gebundene lipidierete Protein wird mit DEAE-Puffer B (20 mM *Tris*, 5 mM *MgCl*₂, 1 M *NaCl*, 2 mM *DTE*, pH 7.4) eluiert. Der Anteil

an Puffer B wird dabei über 5 Säulenvolumen von 0 auf 100% gesteigert. Proteinhaltige Fraktionen wurden durch Absorption bei 280 nm identifiziert und vereinigt.

Die Proteinlösung wird mittels Ultrafiltration (*Amicon Ultra-15 MWCO 10 kD, Millipore*) bei 4000 rpm und 4 °C konzentriert und durch anschließende Zugabe von Puffer (20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTE, pH 7.4) und erneuter Zentrifugation entsalzt.

Proteine mit S-tBu geschützten Cysteinen werden mit 125 mM DTE versetzt und über Nacht entschützt. Die Proteinlösung wird über eine Hi-Trap (desalting column) (20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 7.4) aufgearbeitet und mittels Ultrafiltration (*Amicon Ultra-15 MWCO 10 kD, Millipore*) bei 4000 rpm und 4 °C konzentriert.

Durch den Bradford-Test wird die Proteinkonzentration bestimmt. Das Protein wird aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Charakterisierung erfolgte durch SDS-PAGE und MALDI-MS.

AAV 19: Aufarbeitung nicht lipidierter Proteine mittels aktivierter Thiol-Sepharose nach einer MIC-Ligationen.

Die für die Aufarbeitung notwendigen Puffer müssen vor der Verwendung entgast werden. Der Reaktionsansatz wird auf einer aktivierten Thiol-Sepharose (*GE Healthcare*) Säule für 4h bei 4°C inkubiert. Das ligierte Protein wird mit 5 Säulenvolumen Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂) von der Säule gewaschen.

Die Proteinlösung wird mittels Ultrafiltration in *Amicon Ultra-15 MWCO 10 kD (Millipore)* bei 4000 rpm und 4 °C konzentriert. Durch den Bradford-Test wird die Proteinkonzentration bestimmt. Das Protein wird aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Charakterisierung erfolgte durch SDS-PAGE und MALDI-MS.

Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-G α i

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 1.2 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) G α i-Peptid **40** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 10 mg (0.5 μ M) Cy3-N-Ras Δ 1-181 umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **18** aufgearbeitet. Es konnten 2.4 mg (0.11 μ M, 22%) Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-G α i-Protein isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21519.7$ $m/z_{\text{obs}} = 21520.9$ [M+H]⁺

Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-G α i (Serin-Analogon)

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 1.1 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) G α i-Peptid **41** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 10 mg (0.5 μ M) Cy3-N-Ras Δ 1-181 umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **18** aufgearbeitet. Es konnten 2.6 mg (0.12 μ M, 24%) Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-G α i-Protein (Serin-Analogon) isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21504.6$ $m/z_{\text{obs}} = 21511.1$ [M+H]⁺

Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Fyn

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 1.3 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) Fyn-Peptid **44** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 10 mg (0.5 μ M) Cy3-N-Ras Δ 1-181 umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **18** aufgearbeitet. Es konnten 2.2 mg (0.10 μ M, 20%) Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Fyn-Protein isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21563.7$ $m/z_{\text{obs}} = 21558.1$ [M+H]⁺

Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Fyn (Serin-Analogon)

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 1.1 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) Fyn-Peptid **45** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 10 mg (0.5 μ M) Cy3-N-Ras Δ 1-181 umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **18** aufgearbeitet. Es konnten 2.8 mg (0.13 μ M, 25%) Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Fyn-Protein (Serin-Analogon) isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21533.4$ $m/z_{\text{obs}} = 21535.1$ [M+H]⁺

Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Gap43

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 2.9 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) Gap43-Peptid **46** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 10 mg (0.5 μ M) Cy3-N-Ras Δ 1-181 umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **19** aufgearbeitet.

Es konnten 0.5 mg (0.02 μ M, 4%) Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Gap43-Protein isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 23095.4$ $m/z_{\text{obs}} = 23096.6$ [M+H]⁺

Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Gap43 (Serin-Analogon)

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 2.7 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) Gap43-Peptid **47** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 10 mg (0.5 μ M) Cy3-N-Ras Δ 1-181 umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **19** aufgearbeitet. Es konnten 0.7 mg (0.03 μ M, 5%) Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Gap43-Protein (Serin-Analogon) isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 23064.2$ $m/z_{\text{obs}} = 23051.4$ [M+H]⁺

Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Yes

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 1.3 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) Yes-Peptid **42** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 10 mg (0.5 μ M) Cy3-N-Ras Δ 1-181 umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **18** aufgearbeitet. Es konnten 2.8 mg (0.13 μ M, 26%) Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Yes Protein isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21590.0$ $m/z_{\text{obs}} = 21585.0$ [M+Na]⁺

Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Yes Serin (Analogon)

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 1.1 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) Yes-Peptid **43** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 10 mg (0.5 μ M) Cy3-N-Ras Δ 1-181 umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **18** aufgearbeitet. Es konnten 3.2 mg (0.15 μ M, 30%) Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Yes (Serin-Analogon) Protein isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 21546.1$ $m/z_{\text{obs}} = 21545.4$ [M+H]⁺

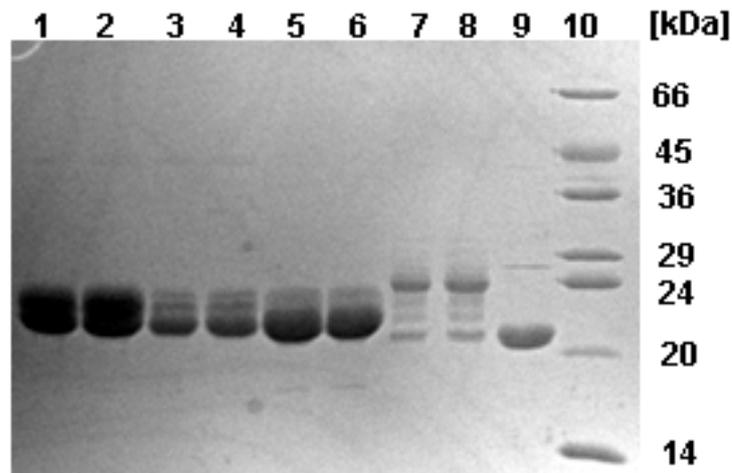


Abbildung 54: SDS-Gel Analyse der Cy3-N-Ras Δ 1-181-Fusionsproteine nach MIC-Ligation und Aufarbeitung. 1: Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-G α i; 2: Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-G α i (Serin-Analogen); 3: Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Fyn; 4: Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Fyn (Serin-Analogen); 5: Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Yes; 6: Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Yes (Serin-Analogen); 7: Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Gap43; 8: Cy3-N-Ras Δ 1-181-MIC-Gap43 (Serin-Analogen); 9: Cy3-N-Ras Δ 1-181; 10: SDS7-Marker.

eGFP-MIC-G α i

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 1.2 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) G α i-Peptid **40** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 13.5 mg (0.5 μ M) eGFP umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **18** aufgearbeitet. Es konnten 3.3 mg (0.12 μ M, 23%) eGFP-MIC-G α i-Protein isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 28091.1$ $m/z_{\text{obs}} = 28091.8$ [M+H]⁺

eGFP-MIC-G α i (Serin-Analogen)

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 1.1 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) G α i-Peptid **41** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 13.5 mg (0.5 μ M) eGFP umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **18** aufgearbeitet. Es konnten 3.1 mg (0.11 μ M, 21%) eGFP-MIC-G α i Protein (Serin-Analogen) isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 28077.1$ $m/z_{\text{obs}} = 28080.0$ [M+H]⁺

eGFP-MIC-Fyn

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 1.3 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) Fyn-Peptid **44** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 13.5 mg (0.5 μ M) eGFP umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **18** aufgearbeitet. Es konnten 3.6 mg (0.13 μ M, 26%) eGFP-MIC-Fyn Protein isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 28136.1$ $m/z_{\text{obs}} = 28133.1$ [M+H]⁺

eGFP-MIC-Fyn (Serin-Analogon)

Zu einer Lösung von 0.5 ml MeOH werden 1.1 mg (1.0 μ M, 2 Äq.) Fyn-Peptid **45** gegeben. Nach AAV **17** wird die Lösung suspendiert und mit 13.5 mg (0.5 μ M) eGFP umgesetzt. Das Proteingemisch wird nach AAV **18** aufgearbeitet. Es konnten 3.9 mg (0.14 μ M, 27%) eGFP-MIC-Fyn Protein (Serin-Analogon) isoliert werden.

MALDI-TOF-MS: $m/z_{\text{calc}} = 28106.1$ $m/z_{\text{obs}} = 28100.9$ [M+H]⁺

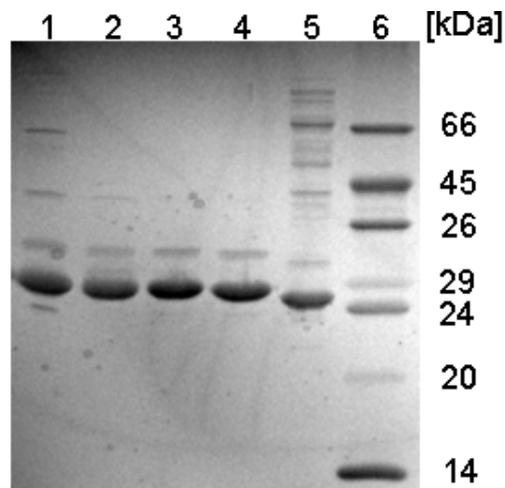


Abbildung 55: SDS-Gel Analyse der eGFP-Fusionsproteine nach MIC-Ligation und Aufarbeitung. 1: eGFP-MIC-Fyn; 2: eGFP-MIC-Fyn (Serin-Analogon); 3: eGFP-MIC-Gai; 4: eGFP-MIC-Gai (Serin-Analogon); 5: eGFP; 6: SDS7-Marker.

7. Literaturverzeichnis

- [1] A. G. Gilman, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 615.
- [2] Y. Takai, T. Sasaki, T. Matozaki, *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 153.
- [3] S. Etienne-Manneville, A. Hall, *Nature* **2002**, *420*, 629.
- [4] S. Pfeffer, D. Aivazian, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 886.
- [5] O. Rocks, A. Peyker, P. I. Bastiaens, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 351.
- [6] B. B. Quimby, M. Dasso, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 338.
- [7] C. D'Souza-Schorey, P. Chavrier, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 347.
- [8] E. Manser, *Dev. Cell* **2002**, *3*, 323.
- [9] A. Bernards, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1603*, 47.
- [10] K. L. Rossman, C. J. Der, J. Sondek, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 167.
- [11] C. DerMardirossian, G. M. Bokoch, *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 356.
- [12] M. C. Willingham, I. Pastan, T. Y. Shih, E. M. Scolnick, *Cell* **1980**, *19*, 1005.
- [13] E. Choy, V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, M. R. Philips, *Cell* **1999**, *98*, 69.
- [14] S. Clarke, *Annual Review of Biochemistry* **1992**, *61*, 355.
- [15] V. Radhika, N. Dhanasekaran, *Oncogene* **2001**, *20*, 1607.
- [16] A. Mor, M. R. Philips, *Annual Review of Immunology* **2006**, *24*, 771.
- [17] F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 241.
- [18] T. S. Reid, *Biochemistry* **2004**, *43*, 9000.
- [19] M. N. Ashby, *Curr. Opin Lipidol.* **1998**, *9*, 99.
- [20] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*, 133.
- [21] O. Rocks, A. Peyker, M. Khams, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, *Science* **2005**, *307*, 1746.
- [22] A. Apolloni, I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 2475.
- [23] J. F. Hancock, A. I. Magee, J. E. Childs, C. J. Marshall, *Cell* **1989**, *57*, 1167.
- [24] T. G. Bivona, S. E. Quatela, B. O. Bodemann, I. M. Ahearn, M. J. Soskis, A. Mor, J. Miura, H. H. Wiener, L. Wright, S. G. Saba, D. Yim, A. Fein, I. Perez de Castro, C. Li, C. B. Thompson, A. D. Cox, M. R. Philips, *Molecular Cell* **2006**, *21*, 481.
- [25] P. Villalonga, C. Lopez-Alcala, M. Bosch, A. Chiloeches, N. Rocamora, J. Gil, R. Marais, C. J. Marshall, O. Bachs, N. Agell, *Molecular and Cellular Biology* **2001**, *21*, 7345.
- [26] R. S. Sidhu, R. R. Clough, R. P. Bhullar, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *304*, 655.
- [27] C. Lopez-Alcala, B. Alvarez-Moya, P. Villalonga, M. Calvo, O. Bachs, N. Agell, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 10621.
- [28] S. J. Abraham, R. P. Nolet, R. J. Calvert, L. M. Anderson, V. Gaponenko, *Biochemistry* **2009**, *48*, 7575.
- [29] C. Herrmann, G. A. Martin, A. Wittinghofer, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 2901.
- [30] J. F. Hancock, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, *4*, 373.
- [31] J. R. Silvius, *Journal of Membrane Biology* **2002**, *190*, 83.
- [32] S. J. Plowman, J. F. Hancock, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2005**, *1746*, 274.
- [33] A. Mor, M. R. Philips, *Annual Review of Immunology* **2006**, *24*, 771.
- [34] M. S. Boguski, F. McCormick, *Nature* **1993**, *366*, 643.
- [35] R. KhosraviFar, S. Campbell, K. L. Rossman, C. J. Der, *Advances in Cancer Research*, Vol 72 **1998**, *72*, 57.

- [36] M. Malumbres, A. Pellicer, *Frontiers in Bioscience* **1998**, 3, D887.
- [37] J. Zuber, O. I. Tchernitsa, B. Hinzmann, A. C. Schmitz, M. Grips, M. Hellriegel, C. Sers, A. Rosenthal, R. Schafer, *Nature Genetics* **2000**, 24, 144.
- [38] G. J. Pronk, J. L. Bos, *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1994**, 1198, 131.
- [39] L. Buday, J. Downward, *Cell* **1993**, 73, 611.
- [40] P. Chardin, J. H. Camonis, N. W. Gale, L. Vanaelst, J. Schlessinger, M. H. Wigler, D. Barsagi, *Science* **1993**, 260, 1338.
- [41] M. A. Simon, G. S. Dodson, G. M. Rubin, *Cell* **1993**, 73, 169.
- [42] N. W. Gale, S. Kaplan, E. J. Lowenstein, J. Schlessinger, D. Barsagi, *Nature* **1993**, 363, 88.
- [43] N. Li, A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Barsagi, B. Margolis, J. Schlessinger, *Nature* **1993**, 363, 85.
- [44] F. McCormick, *Nature* **1993**, 363, 15.
- [45] M. Rozakisadcock, R. Fernley, J. Wade, T. Pawson, D. Bowtell, *Nature* **1993**, 363, 83.
- [46] W. Kolch, A. Kotwaliwale, K. Vass, P. Janosch, *Expert Rev Mol Med* **2002**, 4, 1.
- [47] H. Chong, J. Lee, K. L. Guan, *Embo Journal* **2001**, 20, 3716.
- [48] H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature* **1990**, 348, 125.
- [49] R. J. Davis, *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 14553.
- [50] B. M. T. Burgering, J. L. Bos, *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, 20, 18.
- [51] D. K. Morrison, R. E. Cutler, *Current Opinion in Cell Biology* **1997**, 9, 174.
- [52] T. Bondeva, A. Balla, P. Varnai, T. Balla, *Molecular Biology of the Cell* **2002**, 13, 2323.
- [53] D. K. Morrison, *Journal of Cell Science* **2001**, 114, 1609.
- [54] K. Yeung, T. Seitz, S. F. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy, W. Kolch, *Nature* **1999**, 401, 173.
- [55] P. A. Konstantinopoulos, M. V. Karamouzis, A. G. Papavassiliou, *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6, 541.
- [56] J. L. Bos, *Cancer Res.* **1989**, 49, 4682.
- [57] T. Maniatis, B. Tasic, *Nature* **2002**, 418, 236.
- [58] D. L. Black, *Annual Review of Biochemistry* **2003**, 72, 291.
- [59] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, 7342.
- [60] A. Hershko, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, 5932.
- [61] T. Cardozo, M. Pagano, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2004**, 5, 739.
- [62] N. Zheng, B. A. Schulman, L. Z. Song, J. J. Miller, P. D. Jeffrey, P. Wang, C. Chu, D. M. Koepp, S. J. Elledge, M. Pagano, R. C. Conaway, J. W. Conaway, J. W. Harper, N. P. Pavletich, *Nature* **2002**, 416, 703.
- [63] L. Hicke, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001**, 2, 195.
- [64] J. D. Schnell, L. Hicke, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 35857.
- [65] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annual Review of Biochemistry* **1998**, 67, 425.
- [66] B. M. Turner, *Cell* **2002**, 111, 285.
- [67] M. Y. Li, J. Y. Luo, C. L. Brooks, W. Gu, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 50607.
- [68] R. Marmorstein, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001**, 2, 422.
- [69] S. A. Brooks, *Molecular Biotechnology* **2004**, 28, 241.
- [70] P. Gagneux, A. Varki, *Glycobiology* **1999**, 9, 747.
- [71] M. D. Resh, *Nature Chemical Biology* **2006**, 2, 584.
- [72] D. R. Johnson, R. S. Bhatnagar, L. J. Knoll, J. I. Gordon, *Annual Review of Biochemistry* **1994**, 63, 869.
- [73] M. D. Resh, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1999**, 1451, 1.

- [74] S. McLaughlin, A. Aderem, *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, *20*, 272.
- [75] M. D. Resh, *Aids Reviews* **2005**, *7*, 84.
- [76] D. A. Johnson, P. Akamine, E. Radzio-Andzelm, Madhusudan, S. S. Taylor, *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 2243.
- [77] S. M. Sebti, *Cancer Cell* **2005**, *7*, 297.
- [78] R. S. Goody, A. Rak, K. Alexandrov, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2005**, *62*, 1657.
- [79] M. D. Resh, *Sci STKE* **2006**, *2006*, re14.
- [80] L. E. Dietrich, R. Gurezka, M. Veit, C. Ungermann, *EMBO J.* **2004**, *23*, 45.
- [81] D. J. Bartels, D. A. Mitchell, X. Dong, R. J. Deschenes, *Mol. Cell Biol.* **1999**, *19*, 6775.
- [82] S. Lobo, W. K. Greentree, M. E. Linder, R. J. Deschenes, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 41268.
- [83] A. F. Roth, Y. Feng, L. Chen, N. G. Davis, *J. Cell Biol.* **2002**, *159*, 23.
- [84] D. A. Mitchell, A. Vasudevan, M. E. Linder, R. J. Deschenes, *Journal of Lipid Research* **2006**, *47*, 1118.
- [85] J. A. Duncan, A. G. Gilman, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 15830.
- [86] D. C. Yeh, J. A. Duncan, S. Yamashita, T. Michel, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 33148.
- [87] R. Zeidman, C. S. Jackson, A. I. Magee, *Molecular Membrane Biology* **2009**, *26*, 32.
- [88] P. Deck, D. Pendzialek, M. Biel, M. Wagner, B. Popkirova, B. Ludolph, G. Kragol, J. Kuhlmann, A. Giannis, H. Waldmann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 4975.
- [89] A. E. El-Husseini, E. Schnell, S. Dakoji, N. Sweeney, Q. Zhou, O. Prange, C. Gauthier-Campbell, A. Aguilera-Moreno, R. A. Nicoll, D. S. Bredt, *Cell* **2002**, *108*, 849.
- [90] A. E. D. El-Husseini, D. S. Bredt, *Nature Reviews Neuroscience* **2002**, *3*, 791.
- [91] K. A. Melkonian, A. G. Ostermeyer, J. Z. Chen, M. G. Roth, D. A. Brown, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 3910.
- [92] Y. Webb, L. Hermida-Matsumoto, M. D. Resh, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 261.
- [93] X. Q. Liang, A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, W. Bornmann, P. Tempst, M. D. Resh, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 30987.
- [94] X. Q. Liang, Y. Lu, M. Wilkes, T. A. Neubert, M. D. Resh, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 8133.
- [95] A. Hiol, P. C. Davey, J. L. Osterhout, A. A. Waheed, E. R. Fischer, C. K. Chen, G. Milligan, K. M. Druey, T. L. Z. Jones, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 19301.
- [96] J. L. Osterhout, A. A. Waheed, A. Hiol, R. J. Ward, P. C. Davey, L. Nini, J. Wang, G. Milligan, T. L. Z. Jones, K. M. Druey, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 19309.
- [97] R. M. Peitzsch, S. McLaughlin, *Biochemistry* **1993**, *32*, 10436.
- [98] J. R. Silvius, F. Lheureux, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3014.
- [99] H. Schroeder, R. Leventis, S. Rex, M. Schelhaas, E. Nagele, H. Waldmann, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13102.
- [100] M. H. Gelb, L. Brunsveld, C. A. Hrycyna, S. Michaelis, F. Tamanoi, W. C. Van Voorhis, H. Waldmann, *Nature Chemical Biology* **2006**, *2*, 518.
- [101] G. Kragol, M. Lumbierres, J. M. Palomo, H. Waldmann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 5839.
- [102] H. Waldmann, E. Nagele, *Angewandte Chemie International Edition* **1995**, *34*, 2259.
- [103] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 5954.

- [104] L. Brunsveld, A. Watzke, T. Durek, K. Alexandrov, R. S. Goody, H. Waldmann, *Chemistry-a European Journal* **2005**, *11*, 2756.
- [105] C. Peters, A. Wolf, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 8531.
- [106] R. Machauer, H. Waldmann, *Chemistry-a European Journal* **2001**, *7*, 2940.
- [107] F. Eisele, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 369.
- [108] G. Kragol, M. Lumbierres, J. Palomo, H. Waldmann, *Angewandte Chemie. International Ed. In English* **2004**, 5839.
- [109] C. Peters, H. Waldmann, *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 6053.
- [110] J. M. Palomo, M. Lumbierres, H. Waldmann, *Angewandte Chemie. International Ed. In English* **2006**, *45*, 477.
- [111] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *Chembiochem* **2002**, *3*, 901.
- [112] D. Gottlieb, C. Grunwald, C. Nowak, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *Chemical Communications* **2006**, 260.
- [113] R. C. D. Milton, S. C. F. Milton, P. A. Adams, *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 6039.
- [114] J. P. Tam, Y. A. Lu, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 12058.
- [115] C. Dhalluin, C. Boutillon, A. Tartar, G. Lippens, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 10494.
- [116] N. M. Okeley, M. H. Gelb, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 21833.
- [117] R. S. Goody, K. Alexandrov, M. Engelhard, *Chembiochem* **2002**, *3*, 399.
- [118] L. J. Knoll, J. I. Gordon, *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 4281.
- [119] J. L. Cereghino, J. M. Cregg, *Fems Microbiology Reviews* **2000**, *24*, 45.
- [120] M. B. Slade, K. R. Emslie, K. L. Williams, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* **1997**, *14*, 1.
- [121] D. J. Manstein, K. M. Ruppel, L. Kubalek, J. A. Spudich, *Journal of Cell Science* **1991**, 63.
- [122] A. Kikuchi, T. Yamashita, M. Kawata, K. Yamamoto, K. Ikeda, T. Tanimoto, Y. Takai, *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 2897.
- [123] H. Horiuchi, O. Ullrich, C. Bucci, M. Zerial, *Methods in Enzymology* **1995**, *257*, 9.
- [124] T. Magee, M. C. Seabra, *Current Opinion in Cell Biology* **2005**, *17*, 190.
- [125] F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annual Review of Biochemistry* **1996**, *65*, 241.
- [126] H. W. Park, L. S. Beese, *Current Opinion in Structural Biology* **1997**, *7*, 873.
- [127] R. L. Edelstein, M. D. Distefano, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *235*, 377.
- [128] I. Gaon, T. C. Turek, V. A. Weller, R. L. Edelstein, S. K. Singh, M. D. Distefano, *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 7738.
- [129] T. A. Kale, S. J. Hsieh, M. W. Rose, M. D. Distefano, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2003**, *3*, 1043.
- [130] M. W. Rose, N. D. Rose, J. Boggs, S. Lenevich, J. Xu, G. Barany, M. D. Distefano, *Journal of Peptide Research* **2005**, *65*, 529.
- [131] T. C. Turek, I. Gaon, D. Gamache, M. D. Distefano, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, *7*, 2125.
- [132] A. Kalinin, N. H. Thoma, A. Iakovenko, I. Heinemann, E. Rostkova, A. T. Constantinescu, K. Alexandrov, *Protein Expression and Purification* **2001**, *22*, 84.
- [133] D. J. Owen, K. Alexandrov, E. Rostkova, A. J. Scheidig, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angewandte Chemie. International Ed. In English* **1999**, *38*, 509.
- [134] N. H. Thoma, A. Iakovenko, D. Owen, A. S. Scheidig, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12043.

- [135] C. Budde, M. J. Schoenfish, M. E. Linder, R. J. DescheneS, *Methods* **2006**, 40, 143.
- [136] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, 6705.
- [137] R. M. Hofmann, T. W. Muir, *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13, 297.
- [138] T. J. Tolbert, C. H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 5421.
- [139] J. P. Tam, J. X. Xu, K. D. Eom, *Biopolymers* **2001**, 60, 194.
- [140] G. G. Kochendoerfer, S. B. H. Kent, *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, 3, 665.
- [141] T. W. Muir, *Annual Review of Biochemistry* **2003**, 72, 249.
- [142] V. Muralidharan, T. W. Muir, *Nature Methods* **2006**, 3, 429.
- [143] R. R. Flavell, T. W. Muir, *Accounts of Chemical Research* **2009**, 42, 107.
- [144] C. Ludwig, D. Schwarzer, J. Zettler, D. Garbe, P. Janning, C. Czeslik, H. D. Mootz, *Methods in Enzymology: Non-Natural Amino Acids* **2009**, 462, 77.
- [145] G. B. Fields, Ed., in *Methods in Enzymology, Vol. 289*, Academic Press, San Diego, CA, **1997**.
- [146] T. C. Evans, J. Benner, M. Q. Xu, *Protein Science* **1998**, 7, 2256.
- [147] K. Severinov, T. W. Muir, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273, 16205.
- [148] I. Gariat, T. W. Muir, F. B. Perler, *Genetic Engineering Vol 23* **2001**, 23, 171.
- [149] J. M. Hooker, A. P. Esser-Kahn, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 15558.
- [150] P. C. Lin, S. H. Ueng, M. C. Tseng, J. L. Ko, K. T. Huang, S. C. Yu, A. K. Adak, Y. J. Chen, C. C. Lin, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, 4286.
- [151] J. A. Camarero, Y. Kwon, M. A. Coleman, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 14730.
- [152] Y. Marsac, J. Cramer, D. Olschewski, K. Alexandrov, C. F. W. Becker, *Bioconjugate Chemistry* **2006**, 17, 1492.
- [153] I. Burbulis, K. Yamaguchi, A. Gordon, R. Carlson, R. Brent, *Nature Methods* **2005**, 2, 31.
- [154] C. F. W. Becker, Y. Marsac, P. Hazarika, J. Moser, R. S. Goody, C. M. Niemeyer, *Chembiochem* **2007**, 8, 32.
- [155] I. van Baal, H. Malda, S. A. Synowsky, J. L. J. van Dongen, T. M. Hackeng, M. Merckx, E. W. Meijer, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, 5052.
- [156] J. P. Pellois, M. E. Hahn, T. W. Muir, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 7170.
- [157] Y. J. Lee, S. Datta, J. P. Pellois, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 2398.
- [158] T. Durek, K. Alexandrov, R. S. Goody, A. Hildebrand, I. Heinemann, H. Waldmann, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 16368.
- [159] K. Alexandrov, I. Heinemann, T. Durek, V. Sidorovitch, R. S. Goody, H. Waldmann, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 5648.
- [160] A. Rak, O. Pylypenko, T. Durek, A. Watzke, S. Kushnir, L. Brunsveld, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Science* **2003**, 302, 646.
- [161] M. G. Paulick, M. B. Forstner, J. T. Groves, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104, 20332.
- [162] M. G. Paulick, A. R. Wise, M. B. Forstner, J. T. Groves, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 11543.
- [163] C. Bordier, *Journal of Biological Chemistry* **1981**, 256, 1604.
- [164] K. Weise, G. Triola, L. Brunsveld, H. Waldmann, R. Winter, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 1557.

- [165] S. Janosch, C. Nicolini, B. Ludolph, C. Peters, M. Volkert, T. L. Hazlet, E. Gratton, H. Waldmann, R. Winter, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 7496.
- [166] C. Nicolini, J. Baranski, S. Schlummer, J. Palomo, M. Lumbierres-Burgues, M. Kahms, J. Kuhlmann, S. Sanchez, E. Gratton, H. Waldmann, R. Winter, *Journal of American Chemical Society* **2006**, *128*, 192.
- [167] A. Vogel, C. P. Katzka, H. Waldmann, K. Arnold, M. F. Brown, D. Huster, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12263.
- [168] G. Reuther, K. T. Tan, J. Kohler, C. Nowak, A. Pampel, K. Arnold, J. Kuhlmann, H. Waldmann, D. Huster, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 5387.
- [169] G. Reuther, K. T. Tan, A. Vogel, C. Nowak, K. Arnold, J. Kuhlmann, H. Waldmann, D. Huster, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 13840.
- [170] A. Vogel, G. Reuther, K. Weise, G. Triola, J. Nikolaus, K.-T. Tan, C. Nowak, A. Herrmann, H. Waldmann, R. Winter, D. Huster, *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48*, 8784.
- [171] A. Vogel, K. T. Tan, H. Waldmann, S. E. Feller, M. F. Brown, D. Huster, *Biophysical Journal* **2007**, *93*, 2697.
- [172] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223.
- [173] V. Nancy, I. Callebaut, A. El Marjou, J. de Gunzburg, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 15076.
- [174] M. Gerauer, Doktorarbeit, TU Dortmund (Dortmund), **2008**.
- [175] W. van 't Hof, M. D. Resh, *Journal of Cell Biology* **1997**, *136*, 1023.
- [176] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *Chembiochem* **2002**, *3*, 901.
- [177] M. J. Brown, P. D. Milano, D. C. Lever, W. W. Epstein, C. D. Poulter, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 3176.
- [178] D. Gottlieb, Doktorarbeit, TU Dortmund (Dortmund), **2005**.
- [179] G. K. Toth, Z. Kele, G. Varadi, *Current Organic Chemistry* **2007**, *11*, 409.
- [180] D. M. Rothman, E. M. Vazquez, E. M. Vogel, B. Imperiali, *Organic Letters* **2002**, *4*, 2865.
- [181] D. M. Rothman, M. E. Vazquez, E. M. Vogel, B. Imperiali, *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 6795.
- [182] F. Buller, Masterarbeit, Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Dortmund), **2006**.
- [183] E. Probst, Masterarbeit, Ruhr-Universität Bochum (Dortmund), **2007**.
- [184] L. Brunsveld, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, A. Wittinghofer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 6622.
- [185] J. A. Weston, *Adv. Morphog.* **1970**, *8*, 41.
- [186] L. A. Greene, A. S. Tischler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, *73*, 2424.
- [187] D. Bar-Sagi, J. R. Feramisco, *Cell* **1985**, *42*, 841.
- [188] P. G. Gillespie, R. K. Prusti, E. D. Apel, J. A. Beavo, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 12187.
- [189] S. K. Florio, R. K. Prusti, J. A. Beavo, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 24036.
- [190] A. M. Marzesco, T. Galli, D. Louvard, A. Zahraoui, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 22340.
- [191] M. Hanzal-Bayer, L. Renault, P. Roversi, A. Wittinghofer, R. C. Hillig, *Embo Journal* **2002**, *21*, 2095.
- [192] H. B. Zhang, X. H. Liu, K. Zhang, C. K. Chen, J. M. Frederick, G. D. Prestwich, W. Baehr, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 407.
- [193] E. Kalb, S. Frey, L. K. Tamm, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1992**, *1103*, 307.
- [194] B. Ludolph, F. Eisele, H. Waldmann, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 5954.

- [195] C. Herrmann, G. A. Martin, A. Wittinghofer, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, 2901.
- [196] F. Ghomashchi, X. H. Zhang, L. Liu, M. H. Gelb, *Biochemistry* **1995**, 34, 11910.
- [197] R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1998**, 37, 7640.
- [198] M. O. Roy, R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **2000**, 39, 8298.
- [199] H. Yokoe, T. Meyer, *Nature Biotechnology* **1996**, 14, 1252.
- [200] H. Niv, O. Gutman, Y. I. Henis, Y. Kloog, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 1606.
- [201] H. Niv, O. Gutman, Y. Kloog, Y. I. Henis, *Journal of Cell Biology* **2002**, 157, 865.
- [202] J. A. Thissen, J. M. Gross, K. Subramanian, T. Meyer, P. J. Casey, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 30362.
- [203] Z. Chen, J. C. Otto, M. O. Bergo, S. G. Young, P. J. Casey, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 41251.
- [204] O. Rocks, A. Peyker, P. I. H. Bastiaens, *Current Opinion in Cell Biology* **2006**, 18, 351.
- [205] M. Fivaz, T. Meyer, *Journal of Cell Biology* **2005**, 170, 429.
- [206] P. E. Buckle, R. J. Davies, T. Kinning, D. Yeung, P. R. Edwards, D. Pollardknight, C. R. Lowe, *Biosensors & Bioelectronics* **1993**, 8, 355.
- [207] R. Cush, J. M. Cronin, W. J. Stewart, C. H. Maule, J. Molloy, N. J. Goddard, *Biosensors & Bioelectronics* **1993**, 8, 347.
- [208] T. H. Tian, A. Harding, K. Inder, S. Plowman, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Nature Cell Biology* **2007**, 9, 905.
- [209] A. K. Kenworthy, *Nature Cell Biology* **2007**, 9.
- [210] S. J. Plowman, C. Muncke, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 15500.
- [211] R. Shalom-Feuerstein, S. J. Plowman, B. Rotblat, N. Ariotti, T. H. Tian, J. F. Hancock, Y. Kloog, *Cancer Research* **2008**, 68, 6608.
- [212] K. L. Inder, C. Lau, D. Loo, N. Chaudhary, A. Goodall, S. Martin, A. Jones, D. van der Hoeven, R. G. Parton, M. M. Hill, J. F. Hancock, *Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284, 28410.
- [213] S. J. Plowman, N. Ariotti, A. Goodall, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Molecular and Cellular Biology* **2008**, 28, 4377.
- [214] H. A. Rinia, M. M. E. Snel, J. van der Eerden, B. de Kruijff, *Febs Letters* **2001**, 501, 92.
- [215] M. J. Bijlmakers, M. Marsh, *Trends in Cell Biology* **2003**, 13, 32.
- [216] J. Charollais, F. G. Van Der Goot, *Molecular Membrane Biology* **2009**, 26, 55.
- [217] K. Huang, A. El-Husseini, *Current Opinion in Neurobiology* **2005**, 15, 527.
- [218] J. Greaves, L. H. Chamberlain, *Journal of Cell Biology* **2007**, 176, 249.
- [219] W. vantHof, M. D. Resh, *Journal of Cell Biology* **1997**, 136, 1023.
- [220] C. S. Fishburn, P. Herzmark, J. Morales, H. R. Bourne, *J Biol Chem* **1999**, 274, 18793.
- [221] A. el Husseini, E. Schnell, S. Dakoji, N. Sweeney, Q. Zhou, O. Prange, C. Gauthier-Campbell, A. Aguilera-Moreno, R. A. Nicoll, D. S. Bredt, *Cell* **2002**, 108, 849.
- [222] L. Zhao, S. Lobo, X. Dong, A. D. Ault, R. J. Deschenes, *J.Biol.Chem.* **2002**, 277, 49352.
- [223] O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. Bastiaens, *Science* **2005**, 307, 1746.
- [224] J. T. Swarthout, S. Lobo, L. Farh, M. R. Croke, W. K. Greentree, R. J. Deschenes, M. E. Linder, *J Biol Chem* **2005**, 280, 31141.
- [225] J. Y. Lu, S. L. Hofmann, *J.Biol.Chem.* **1995**, 270, 7251.

- [226] T. L. Baker, H. Zheng, J. Walker, J. L. Coloff, J. E. Buss, *J.Biol.Chem.* **2003**, 278, 19292.
- [227] J. R. Silvius, P. Bhagatji, R. Leventis, D. Terrone, *Mol Biol Cell* **2006**, 17, 192.
- [228] M. E. Linder, R. J. Deschenes, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, 8, 74.
- [229] R. Tsutsumi, Y. Fukata, M. Fukata, *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **2008**, 456, 1199.
- [230] J. E. Smotrys, M. E. Linder, *Annual Review of Biochemistry* **2004**, 73, 559.
- [231] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, 34, 3813.
- [232] A. E. El-Husseini, S. E. Craven, D. M. Chetkovich, B. L. Firestein, E. Schnell, C. Aoki, D. S. Bredt, *Journal of Cell Biology* **2000**, 148, 159.
- [233] J. Greaves, G. R. Prescott, Y. Fukata, M. Fukata, C. Salaun, L. H. Chamberlain, *Molecular Biology of the Cell* **2009**, 20, 1845.
- [234] M. Lumbierres, J. Palomo, G. Kragol, S. Roehrs, O. Müller, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 7405.

8. Abkürzungsverzeichnis

AcOH	Essigsäure
Alloc	Allyloxycarbonylgruppe
Äq.	Äquivalent
ber.	berechnet
<i>t</i> Bu	tert-Butyl
Boc	Di-tert-butyldicarbonat
cHex	Cyclohexan
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDT	Ethandithiol
EE	Ethylacetat
ESI	electron spray ionization
Far	Farnesyl
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FTase	Farnesyltransferase
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GerGer	Geranylgeranyl
h	Stunde
HATU	(2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat)
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HCTU	2-(6-Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium- hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
HPLC	high performance liquid chromatography
HR-MS	high resolution mass spectrometry

Abkürzungsverzeichnis

KG	Kieselgel
LC	liquid phase chromatography
MAP	mitogen-activated-protein
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MIC	Maleinimidocaproyl
min	Minute
PE	Petrolether
REP	rab escort protein
R _f	Retentionsfaktor
RU	relative Einheiten
s	Sekunden
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
t _R	Retentionszeit
Trt	Trityl

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Ein- oder Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Comission of BiocheMICAL Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, 54, 1517 und 1525).

9. Anhang

9.1 *Danksagung*

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich herzlich für die interessante Themenstellung, anregenden Diskussionen und die Freiheit bei der Durchführung dieser Arbeit, sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Für die Einarbeitung und Betreuung danke ich Prof. Dr. ir. Luc Brunsveld. Herrn Prof. Dr. A. Wittinghofer, Herrn Prof. Dr. R. Winter, Herrn Prof. Dr. P. Bastiaens und ihren Mitarbeitern danke ich für die Zusammenarbeit in interessanten Kooperationen und für die Möglichkeit in ihren Arbeitskreisen Messungen durchführen zu können.

Allen, die zum Erfolg dieser Projekte beigetragen haben, sei ebenfalls gedankt: E. Probst, F. Buller, Dr. K. Uhlenbrock, Dr. L. Gremer, Dr. K. Weise, Andrea Gohlke, Dr. O. Rocks, Dr. M. Gerauer, Dr. G. Triola, Dr. Y. Chen K. Görmer, Dr. D. Das und C. Novak.

Ein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und an der Universität Dortmund, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hervorzuheben ist hier Dr. Petra Janning für Hilfe in allen analytischen Fragestellungen.

Allen Mitarbeitern in der Abteilung Chemische Biologie am Max-Planck-Institut Dortmund möchte ich für die freundschaftlich-kollegiale Arbeitsatmosphäre danken. Dies gilt insbesondere für meine Laborkollegen Tobias Zimmermann, Luc Eberhard und Melanie Schwalfenberg.

Im großen Kommen und Gehen waren mir Tobias Zimmermann, Luc Eberhard, Melanie Schwalfenberg, Wolfram Wilk, Tanja Knoth, Marion Müller, Dirk Weinrich, Bernhard Ellinger und Torben Leßmann besonders wichtige Freunde, denen ich für bleibende Erinnerungen an gemeinsame Unternehmungen in Dortmund dankbar bin. Für das zügige Korrigieren dieser Arbeit geht ein herzlicher Dank an Tobias Zimmerman und Melanie Schwalfenberg.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern und meinem Bruder für die fortwährende Unterstützung und Aufmunterungen während all der Jahre der Promotion und des Studiums.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen Christina für ihre unendliche Geduld und liebevolle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

9.2 *Lebenslauf*

Persönliche Daten:

Name	Koch, Sebastian
Geburtsdatum und -ort	02. Dezember 1980, Marburg/Lahn
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

08/1987 - 08/1991	Grundschule, Amöneburg
08/1991 - 06/2000	Stiftsschule St. Johann Amöneburg; Abitur

Universitätsausbildung

04/2001 - 10/2002	Chemie Grundstudium, Phillips-Universität Marburg
10/2002 - 09/2005	Chemie Hauptstudium, Phillips-Universität Marburg
01/2005- 09/2005	Diplomarbeit, Phillips-Universität Marburg; Betreuer: Prof. Dr. T. Schrader; Thema: Massgescheiderte polymere Rezeptoren für Proteinoberflächen

Promotion

12/2005-	TU Dortmund, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie Betreuer: Prof. Dr. H. Waldmann Thema: Synthese und biophysikalische Evaluierung von H- und K-Ras-Proteinen sowie Arbeiten zur Aufklärung des Protein-Acylierungskreislaufes
----------	---

9.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, 18.12.2009

Sebastian Koch